

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**Mgr. Karla Svobodová**

**Klonální vývoj leukemických buněk a jeho úloha při progresi leukémií a  
preleukémií**

Clonal evolution of leukemic cells and its role in the progression of leukemia and  
preleukemia

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne .....

.....

Karla Svobodová

**Identifikační záznam:**

SVOBODOVÁ, Karla. *Klonální vývoj leukemických buněk a jeho úloha při progresi leukémií a preleukémií. [Clonal evolution of leukemic cells and its role in the progression of leukemia and preleukemia]*. Praha, 2020. 101 s., 7 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Centrum nádorové cytogenomiky ÚLBLD. Školitel Zemanová, Zuzana.

## Abstrakt

Klonální vývoj je vícestupňový proces, který je spojen s progresí choroby, zhoršenou prognózou a kratším celkovým přežitím pacientů. Cílem disertační práce byla detailní charakterizace změn nalezených u pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS) a klonálním vývojem a zhodnocení jejich prognostického významu.

Detailní cytogenomickou analýzu jsme provedli u 36/469 (8 %) nemocných s potvrzeným lineárním klonálním vývojem. V diagnostických vzorcích jsme popsali 57 primárních abnormalit (32 % MDS specifické), z toho nejpočetněji delece dlouhých ramen chromosomu 5. V průběhu klonálního vývoje jsme prokázali 156 sekundárních aberací (21 % MDS specifické), z nichž nejčastější byla trisomie/tetrasomie chromosomu 8. U 19 % pacientů jsme identifikovali oblasti získané uniparentální disomie (aUPD). U MDS specifických aUPD 4q, 11q a 17p jsme prokázali homozygotní mutace genů *TET2*, *c-CBL* a *TP53*. Nalezli jsme statisticky významný rozdíl v celkovém přežití mezi skupinami pacientů rozdělených podle nálezu aberací viditelných v mikroskopu a kryptických změn v době diagnózy. U pacientů s klonálním vývojem před léčbou bylo 54 % aberací charakteru nadpočetných kopií celých chromosomů, naopak u nemocných s klonálním vývojem po léčbě jsme až ve 44 % identifikovali monosomie nebo delece.

Studium klonálního vývoje slouží nejen k objasnění patogeneze MDS, ale i k upřesnění prognostického významu aberací získaných při progresi onemocnění. Analýzy kryptických změn mohou být velmi nápomocné při hledání nových terapeutických cílů a při individualizaci léčby.

**Klíčová slova:** myelodysplastické syndromy, klonální vývoj, kryptické aberace, získaná uniparentální disomie

## Abstract

Clonal evolution is a multistep process characterized by progression of the disease, adverse prognosis and shortening of overall survival. The aim of the dissertation was a detailed characterization of identified changes in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and clonal evolution and evaluation of their prognostic impact.

We performed detail cytogenomic analyses in 36/469 (8%) patients with confirmed linear clonal evolution. We described 57 primary abnormalities (32% MDS-specific) at the time of diagnosis, the most frequent was deletion of long arm of chromosome 5. We proved 156 secondary aberrations (21% MDS-specific) during the course of the clonal evolution, the most frequent were trisomies/tetrasomies of chromosome 8. We identified acquired uniparental disomies (aUPD) in 19% of patients. In MDS-specific aUPDs 4q, 11q and 17p, we proved homozygous mutations of *TET2*, *c-CBL* and *TP53* genes. We found a statistically significant difference in overall survival between the groups of patients divided according to their diagnostic cytogenomic findings. In patients with clonal evolution before treatment 54% of aberrations were gains of whole chromosomes, by contrast 44% of abnormalities identified in patients with clonal evolution after treatment were monosomies or deletions.

The study of clonal evolution serves not only as the clarification of MDS pathogenesis, but also as the specification of importance of aberrations acquired during the disease progression. Analyses of cryptic changes can be the basis of searching for novel therapeutic targets and of individualization of the treatment.

**Keywords:** myelodysplastic syndromes, clonal evolution, cryptic aberrations, acquired uniparental disomy

Na tomto místě bych ráda poděkovala především mé školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a celkovou podporu nejen po dobu doktorského studia.

Rovněž bych chtěla poděkovat celému kolektivu z Centra nádorové cytogenomiky ÚLBD VFN a 1.LF UK a Cytogenetického oddělení ÚHKT za přátelské a zároveň profesionální pracovní prostředí na špičkové úrovni, za možnost získávání zkušeností a za jejich vstřícnost. Chtěla bych poděkovat Mgr. Halce Lhotské, Ph.D. za veškerou podporu, obdivuhodnou vytrvalost a nehynoucí optimismus.

Kolegyním z Oddělení genomiky ÚHKT, jmenovitě Mgr. Monice Belíčkové Ph.D. a Mgr. Jitce Veselé, bych velice ráda vyjádřila svou vděčnost za cenné rady, konzultace a nekonečnou trpělivost.

V neposlední řadě děkuji všem lékařům z I. interní kliniky VFN a ÚHKT za poskytnutí klinických údajů a dlouhodobou spolupráci.

## SEZNAM ZKRATEK

<b>aCGH/SNP</b>	Array-comparative genomic hybridization/single nucleotide polymorphism (komparativní genomová hybridizace/jednonukleotidové polymorfismy na mikročipech)
<b>AML</b>	Akutní myeloidní leukémie
<b>ASCT</b>	Allogenic stem cell transplantation (alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk)
<b>aUPD</b>	Acquired uniparental disomy (získaná uniparentální disomie)
<b>BAC</b>	Bacterial artificial chromosome
<b>CCD</b>	Chargé coupled device (digitální chlazená kamera)
<b>CCR</b>	Commonly retained region (společná zachovaná oblast)
<b>CCUS</b>	Clonal cytopenia of undetermined significance (klonální cytopenie neurčitěho významu)
<b>CDR</b>	Commonly deleted region (obvykle deletovaná oblast)
<b>CHIP</b>	Clonal hematopoiesis of undeterminate potential (klonální hematopoéza neurčitěho významu)
<b>CMML</b>	Chronická myelomonocytární leukémie
<b>CN-LOH</b>	Copy number neutral loss of heterozygosity (získaná uniparentální disomie)
<b>COSMIC</b>	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
<b>EFS</b>	Event free survival (přežití do události)
<b>FAB</b>	Francouzsko-americko-britská
<b>HMA</b>	Hypomethylating agents (hypometylační látky)
<b>I-FISH</b>	Interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>ICUS</b>	Idiopathic cytopenia of undetermined significance (idiopatická cytopenie neurčitěho významu)
<b>IDUS</b>	Idiopathic dysplasia of undetermined significance (idiopatická dysplázie neurčitěho významu)
<b>IPSS</b>	International Prognostic Scoring System (Mezinárodní prognostický skórovací systém)

<b>IPSS-R</b>	International Prognostic Scoring System Revised (Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém)
<b>IPSS-Rm</b>	The Revised International Prognostic Scoring System „Molecular“ (Molekulární revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém)
<b>ISCN</b>	An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (mezinárodní cytogenomická nomenklatura)
<b>KD</b>	Kostní dřeň
<b>LD-ARA-C</b>	Low-dose cytosine arabinoside (nizce dávkovaný cytarabin)
<b>mBAND</b>	Mnohobarevné pruhování
<b>MDS</b>	Myelodysplastic syndromes (myelodysplastické syndromy)
<b>MDS-AML</b>	AML s myelodysplastickými rysy
<b>MDS-EB</b>	MDS with excess blasts (MDS s přebytkem blastů)
<b>MDS-EB1</b>	MDS with excess blasts 1 (MDS s přebytkem blastů 1)
<b>MDS-EB2</b>	MDS with excess blasts 2 (MDS s přebytkem blastů 2)
<b>MDS-MLD</b>	MDS with multilineage dysplasia (MDS s multilineární dysplázií)
<b>MDS/MPN</b>	Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (Myelodysplastická/myeloproliferativní nemoc)
<b>MDS-RS</b>	MDS with ring sideroblasts (MDS s prstenčitými sideroblasty)
<b>MDS-RS-MLD</b>	MDS-RS with multilineage dysplasia (MDS-RS s multilineární dysplázií)
<b>MDS-RS-SLD</b>	MDS-RS and single lineage dysplasia (MDS-RS s jednou dysplastickou linií)
<b>MDS-SLD</b>	MDS with single lineage dysplasia (MDS s jednou dysplastickou linií)
<b>MDS-U</b>	MDS, unclassifiable (MDS neklasifikovaný)
<b>mFISH</b>	Mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>NCBI</b>	ClinVar at the National Center of Biotechnology Information



<b>NGS</b>	Next generation sequencing (sekvenování nové generace)
<b>OS</b>	Overall survival (celkové přežití)
<b>PK</b>	Periferní krev
<b>RA</b>	Refractory anemia (refrakterní anémie)
<b>RAEB</b>	RA with excess of blasts (RA s přebytkem blastů)
<b>RAEB-T</b>	RAEB in transformation (RAEB v transformaci)
<b>RARS</b>	RA with ring sideroblasts (RA s prstenčitými sideroblasty)
<b>UPD</b>	Uniparental disomy (uniparentální disomie)
<b>WHO</b>	World Health Organization (Mezinárodní zdravotnická organizace)
<b>WPSS</b>	WHO Classification-Based Prognostic Scoring System

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Myelodysplastické syndromy .....</b>	<b>12</b>
1.1.1	Klinické projevy a diagnostika .....	14
1.1.2	Klasifikace .....	16
1.1.3	Léčba.....	20
1.1.3.1	MDS s nízkým rizikem .....	21
1.1.3.2	MDS s vysokým rizikem .....	21
1.1.3.3	Podpůrná terapie .....	22
<b>1.2</b>	<b>Cytogenetické a molekulárně-genetické změny u MDS .....</b>	<b>23</b>
1.2.1	Ztráta heterozygosity .....	23
1.2.1.1	Delece .....	23
1.2.1.2	Získaná uniparentální disomie .....	26
1.2.2	Zisk/amplifikace .....	29
1.2.3	Mutace .....	30
<b>1.3</b>	<b>Klonální vývoj .....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Metody .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Klasická cytogenetická analýza .....	40
3.2.2	Molekulárně-genetická analýza .....	40
3.2.2.1	I-FISH analýza .....	40
3.2.2.2	mFISH/mBAND analýza .....	41
3.2.2.3	Mikročipové metody .....	41
3.2.2.4	Sekvenační metody .....	42
3.2.3	Statistická analýza.....	43
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Lineární klonální vývoj .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Chromosomové změny .....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Primární aberace .....	46
4.2.1.1	Přehled primárních chromosomových aberací .....	46
4.2.1.2	MDS specifické primární změny .....	47

4.2.1.3	Kryptické primární změny .....	48
4.2.2	Sekundární aberace .....	49
4.2.2.1	Přehled sekundárních chromosomových aberací.....	49
4.2.2.2	MDS specifické sekundární změny .....	50
4.2.2.3	Kryptické sekundární změny .....	51
<b>4.3</b>	<b>Získaná uniparentální disomie .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>Rozdělení nemocných podle nálezu v době diagnózy .....</b>	<b>54</b>
4.4.1	Skupina 1 – normální karyotyp.....	55
4.4.2	Skupina 2 – jedna aberace .....	56
4.4.3	Skupina 3 – dvě aberace .....	57
4.4.4	Skupina 4 – tři a více změn.....	58
4.4.5	Porovnání skupin .....	59
4.4.6	Statistické analýzy .....	60
<b>4.5</b>	<b>Vliv léčby na vznik klonálního vývoje.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ.....</b>	<b>99</b>

# 1 ÚVOD

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium cytogenomického klonálního vývoje u pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS).

Diagnóza MDS byla pravděpodobně poprvé popsána již roku 1900 jako makrocytární anémie progredující do akutní leukémie. V závislosti na pozorovaných projevech a laboratorních nálezech se název onemocnění v průběhu desetiletí mnohokrát změnil. Například se používal termín pseudoaplastická anémie ve spojení s typickou cytopenií v periferní krvi (PK) a naopak hypercelulární kostní dřeň (KD). U části nemocných s makrocytární anémií byla pozorována progresse do akutní myeloidní leukémie (AML), proto byly pro tuto diagnózu od 40. let 20. století používány termíny preleukémie, preleukemická anémie, doutnající leukémie nebo sideroblastická leukémie. Časem se ale ukázalo, že celá řada nemocných do stádia leukémie nedospěje a často umírají spíše na komplikace spojené s cytopeniemi. V 70. letech 20. století se tedy začalo uvažovat o nové terminologii, která by přesněji vyjádřila základní charakteristiku onemocnění, a to morfologickou dysplázií krvetvorných buněk a s tím spojené selhání funkce KD. Terminologie byla sjednocena roku 1976 francouzsko-americko-britskou (FAB) kooperativní skupinou, která definovala dvě kategorie pro dysmyelopoetické syndromy: refrakterní anémie s přebytkem blastů (RAEB) a chronická myelomonocytární leukémie (CMML) (Bennett JM *et al.*, 1976). Roku 1982 FAB skupina vytvořila podrobnější dělení MDS na pět kategorií, které se stalo standardem pro diagnostiku tohoto onemocnění po následujících 20 let a je základem v současnosti užívané klasifikace (Bennett JM *et al.*, 1982).

## 1.1 Myelodysplastické syndromy

MDS představují heterogenní skupinu klonálních onemocnění KD charakterizovanou především neefektivní krvetvorbou, která způsobuje periferní cytopenii v jedné či více krvetvorných liniích (mono-, bi- či pancytopenie). Zpravidla hypercelulární KD je charakteristická abnormální diferenciací a maturací myeloidních buněk (Valent P *et al.*, 2007; Nimer SD, 2008). Vysoká míra genomové nestability patologických buněk KD je spojena s rizikem transformace do AML.

Patogeneze MDS, přesto že je intenzivně zkoumána, nebyla dosud uspokojivě objasněna. Podobně jako u jiných onkologických onemocnění se i u hematologických

malignit předpokládá, že jde o vícestupňový proces, při kterém dochází k postupné akumulaci mutací (Ganguly BB *et al.*, 2018). Průběžný zisk genetických a epigenetických změn poskytuje abnormální kmenové buňce růstovou výhodu, kvůli níž může dojít k rozvoji onemocnění a vzniku klinických příznaků (Raza A a Galili N, 2012; Ganguly BB *et al.*, 2018). MDS se vyznačuje nejen vysokou heterogenitou klinických projevů, ale i poměrně širokou škálou nalézaných chromosomových a genových mutací ovlivňujících proliferaci, diferenciaci a maturaci buněk, jejichž výsledkem je suprese normální hematopoézy (Ganguly BB *et al.*, 2018).

Zhruba 90 % MDS vzniká *de novo* bez zjevné příčiny a jejich etiologie není dosud objasněna (Barzi A a Sekeres MA, 2010). V takovém případě mluvíme o primárních MDS. Pravděpodobně zde hrají roli genetické i environmentální faktory. Z genetického hlediska je známá vyšší incidence u některých vrozených onemocnění jako Downův syndrom, Fanconiho anémie a Bloomův syndrom (Strom SS *et al.*, 2005; Barzi A a Sekeres MA, 2010). U nemocných s kongenitálním onemocněním je zpravidla věk v době diagnózy výrazně nižší. Mezi uváděné faktory prostředí patří například vystavení radiaci, benzenu a jiným organickým rozpouštědlům, pesticidům nebo barvám na vlasy (Germing U *et al.*, 2008; Björk J *et al.*, 2009; Barzi A a Sekeres MA, 2010).

Sekundární MDS představují kolem 10 % diagnóz a jejich příčinou je zpravidla předchozí léčba jiné onkologické malignity, jako jsou radioterapie a chemoterapie (zejména alkylační cytostatika a inhibitory topoizomeráz). Obecně mají sekundární MDS horší prognózu přežití než primární (Ma X *et al.*, 2007; Barzi A a Sekeres MA, 2010).

Onemocnění postihuje převážně starší populaci (Sekeres MA *et al.*, 2006; Ma X *et al.*, 2007; Rollison DE *et al.*, 2008; Sandhu SK a Sekeres MA, 2008; Červinek L, 2015). MDS mohou být diagnostikovány v jakémkoliv věku, vzácně i u dětí (5 %), ale přibližně 72 % pacientů je v době diagnózy starších 70 let a frekvence výskytu onemocnění se s věkem výrazně zvyšuje (Hasle H *et al.*, 2003; Barzi A a Sekeres MA, 2010; Wlodarski MW *et al.*, 2018). Incidence se pohybuje kolem 4-5 nově diagnostikovaných nemocných na 100 000 obyvatel ročně. U lidí starších 80 let je však výskyt již kolem 36 pacientů na 100 000. Celkově mezi pacienty převládají muži, s výjimkou subtypu MDS s izolovanou delecí dlouhých ramen chromosomu 5 – del(5q), který je naopak častější u žen (Greenberg PL *et al.*, 2011).

### 1.1.1 Klinické projevy a diagnostika

U mnoha pacientů je choroba asymptomatická a je diagnostikována náhodně při preventivním vyšetření krevního obrazu (Barzi A a Sekeres MA, 2010). Zpravidla je prvním nálezem anémie, trombocytopenie nebo neutropenie. Symptomy choroby se objevují ve chvíli, kdy KD ztrácí schopnost produkovat normální funkční krevní buňky a variabilita příznaků závisí na typu postižených buněk KD.

Až 80 % nemocných trpí anémií, jejíž projevy jsou zejména bledost, dušnost a extrémní únava i při velmi malé fyzické zátěži (Steensma DP a Bennett JM, 2006). Mezi závažnější příznaky patří bolesti hlavy, tachykardie, hypotenze a angina pectoris (Barzi A a Sekeres MA, 2010). Zhruba 40 % pacientů má v době diagnózy trombocytopenii nebo neutropenii (Steensma DP a Bennett JM, 2006). Nemocní s trombocytopenií mají problémy zejména s různě rozsáhlým krvácením, především ve formě krevních podlitin pod kůží (Barzi A a Sekeres MA, 2010). Neutropenie se projevuje snížením počtu neutrofilních leukocytů, které jsou nezbytné pro imunitní obranu organismu. Nemocní s neutropenií tak trpí únavou a opakovanými bakteriálními infekcemi.

Pokud je u pacienta potvrzena cytopenie v jedné krvetvorné linii je nejdříve třeba vyloučit jiné než hematologické příčiny (Barzi A a Sekeres MA, 2010). U anémie je třeba uvažovat o možném gastrointestinálním krvácení, srdečních příčinách nebo nedostatečné výživě. Anémii mohou způsobit také některé léky (metotrexát, fenobarbital) a infekční agens (HIV, hepatitida, parvovirus) (Barzi A a Sekeres MA, 2010; Steensma DP *et al.*, 2015). V případě izolované trombocytopenie nebo kombinované bicytopenie je třeba vyloučit splenomegalii, která je u MDS pacientů vzácná a je typická spíše pro myeloproliferativní a lymfoproliferativní neoplázie (Barzi A a Sekeres MA, 2010). Je třeba také uvažovat o autoimunitních onemocněních jako idiopatická trombocytopenická purpura, hemolytická anémie nebo vaskulitidy. Pokud jsou vyloučeny jiné příčiny cytopenie, případně je prokázána pancytopenie, je vhodné přistoupit k vyšetřením PK a KD k upřesnění diagnózy.

Základním vyšetřením v diagnostice MDS je stanovení krevního obrazu za účelem zhodnocení dysplastických změn a stanovení počtu blastických elementů v PK (Killick SB *et al.*, 2014; Červinek L, 2015). Následné vyšetření KD poskytuje možnost posouzení dřevňové buněčnosti, morfologie buněk a počtu blastů. Vzorky KD jsou současně vyšetřovány také cytogeneticky, imunofenotypizačně a metodami molekulární

genetiky. Cytogenetické vyšetření představuje v současnosti důležitou metodu přinášející zásadní informace jak k diagnostice, tak určení prognózy. Neméně důležitým se v posledních letech stává i molekulárně-genetické vyšetření KD (Červinek L, 2015). Nové metody sekvenace umožňují detekci genetických změn v tumor-supresorových genech a onkogenech souvisejících s transkripcí DNA, funkcí spliceozómu, epigenetickou modifikací DNA a histonů, signalizací buněk nebo reparací DNA.

Konečné stanovení diagnózy MDS může být i přes všechna provedená vyšetření v některých případech obtížné, ať už se jedná o pacienty bez cytogenetické abnormality s mírnou cytopenií, o nemocné s typickým karyotypem bez dysplázie nebo o transfúzně dependentní pacienty s makrocytární anémií bez cytogenetických a dysplastických změn (Valent P *et al.*, 2007). Proto jsou stanovena základní diagnostická kritéria, která musí být splněna pro potvrzení této diagnózy (Tab. 1).

I přes veškerou snahu o precizní klasifikaci a specifikaci jednotlivých subtypů zůstává v péči hematologů řada pacientů, kteří nesplňují diagnostická kritéria pro MDS. Problémem je nález klonální hematopoézy, případně potvrzení mutací známých u hematologických onemocnění i u potenciálně zdravé populace (Link DC a Walter MJ, 2016; Ganguly BB *et al.*, 2018; Steensma DP *et al.*, 2015). Jde především o mutace v genech pro sestřih mRNA, epigenetické úpravy DNA a chromatinu nebo v genech pro opravy DNA (Ganguly BB *et al.*, 2018). Nález se zpravidla týká populace starší 65 let s normálním počtem krvetvorných buněk bez klinických projevů onemocnění (Steensma DP *et al.*, 2015). Pro tuto skupinu byla zavedena diagnóza „klonální hematopoéza neurčitěho významu“ (CHIP, clonal hematopoiesis of indeterminate potential). Předpokládalo se, že by mohlo jít o premaligní stádium MDS, nicméně pouze u malého procenta lidí s touto diagnózou (~4 %) se rozvine myeloidní malignita (Genovese G *et al.*, 2014; Jaiswal S *et al.*, 2014; Link DC a Walter MJ, 2016). S klonální hematopoézou souvisí také další premaligní diagnózy zavedené v posledních letech: idiopatická cytopenie neurčitěho významu (ICUS, idiopathic cytopenia of undetermined significance), klonální cytopenie neurčitěho významu (CCUS, clonal cytopenia of undetermined significance) a idiopatická dysplázie neurčitěho významu (IDUS, idiopathic dysplasia of undetermined significance) (Valent P *et al.*, 2009; Valent P *et al.*, 2011; Valent P *et al.*, 2012; Steensma DP *et al.*, 2015).

**Tabulka 1:** Minimální diagnostická kritéria u MDS (Valent P *et al.*, 2007)

<b>Diagnostická kritéria<sup>a</sup></b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Konstantní cytopenie v jedné či více buněčných liniích:</li> </ul>	erytrocyty	hemoglobin <11 g/dl
	neutrofily	absolutní počet neutrofilů <1500 $\mu\text{l}^{-1}$
	megakaryocyty	krevní destičky <100 000 $\mu\text{l}^{-1}$
<ul style="list-style-type: none"> <li>Vyloučení jiných hematologických a nehematologických příčin cytopenie nebo dysplázie.</li> </ul>		
<b>Kritéria spojená s MDS diagnózou (rozhodující)</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Dysplázie minimálně v 10 % všech buněk v jedné krvetvorné linii: erytroidní, neutrofilní, megakaryocytární nebo &gt;15 % prstenčitých sideroblastů</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>5–19 % blastů v nátěru KD</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Typická chromosomová abnormalita<sup>b</sup></li> </ul>		
<b>Další kritéria</b> (pro nemocné, kteří splňují diagnostická kritéria, ale nejsou přítomna kritéria spojená s MDS diagnózou)		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Abnormální fenotyp buněk KD ukazující na monoklonální populaci erytroidních a/nebo myeloidních buněk</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Molekulární potvrzení monoklonální buněčné populace</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Snížená tvorba kolonií buněk KD a/nebo cirkulujících progenitorových buněk</li> </ul>		

<sup>a</sup> Diagnóza MDS může být stanovena, pokud jsou splněna obě diagnostická kritéria a minimálně jedno kritérium spojené s diagnózou MDS. Pokud není splněno žádné z rozhodujících kritérií a pacient přesto trpí klonální myeloidní nemocí je třeba aplikovat další kritéria, která vedou k diagnóze MDS nebo minimálně suspektní MDS.

<sup>b</sup> Pokud je typická chromosomová aberace jediným splněným kritériem spojeným s MDS, měla by být stanovena diagnóza suspektní MDS.

### 1.1.2 Klasifikace

První klasifikační systém pro diagnózu MDS byl vytvořen roku 1976 FAB skupinou, která jej roku 1982 přepracovala a rozdělila do pěti kategorií: refrakterní anémie (RA), refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS), refrakterní anémie s přebytkem blastů (RAEB), refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci (RAEB-T) a chronická myelomonocytární leukémie (CMML) (Bennett JM *et al.*, 1976; Bennett JM *et al.*, 1982). Tato klasifikace zohledňovala zejména cytomorfologické abnormality a procentuální zastoupení blastů v KD. FAB klasifikace byla základem novějšího klasifikačního systému, který vydala Mezinárodní zdravotnická organizace



(WHO; World Health Organization) v roce 2000 (Bennet JM, 2000; Bennett JM, 2005; Valent P *et al.*, 2007).

Zatímco předchozí klasifikace byla založena především na morfologických kritériích, WHO klasifikace zahrnuje mezi kritéria také cytogenetické nálezy v KD pacientů. Diagnóza RAEB-T byla přesunuta do skupiny AML, diagnózy RA a RARS byly rozděleny s ohledem na počet dysplastických linií a byla také definována nová cytogenetická subvarianta MDS s izolovanou del(5q). Zároveň byla horní procentuální hranice počtu blastů v KD pozměněna z původních 30 na 20 %. Tento systém byl v letech 2008 a 2016 revidován a jeho současná podoba je uvedena v tabulce 2 (Brunner RD *et al.*, 2008; Arber DA *et al.*, 2016). Z důvodu velké heterogenity MDS se však stále vyskytuje mnoho nemocných, jejichž diagnóza je obtížně zařaditelná do jednotlivých subtypů dle WHO klasifikace. Proto byla kromě jiného vytvořena podskupina MDS neklasifikovaný (MDS-U), kam jsou zařazováni pacienti, kteří nesplňují všechna diagnostická kritéria. Některé formy MDS mají spíše rysy myeloproliferativního onemocnění a byla pro ně zavedena kategorie myelodysplastických/myeloproliferativních nemocí (MDS/MPN), kam je nově řazena i diagnóza CMML (Arber DA *et al.*, 2016).

Pro stanovení prognózy pacientů a jejich přežití bylo v průběhu let zavedeno několik prognostických skórovacích systémů, které vycházely podobně jako WHO klasifikace z procentuálního zastoupení blastů v KD, cytogenetických nálezů a počtu cytopenií. V roce 1997 byl zaveden Mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS; International Prognostic Scoring System), který se stal zlatým standardem při stanovení rizikovosti choroby u *de novo* diagnostikovaných MDS (Greenberg P *et al.*, 1997) a kromě dříve uvedených parametrů zohlednil také stratifikaci pacientů podle věku. Tento systém byl v roce 2012 revidován s označením IPPS-R (International Prognostic Scoring System Revised) (Greenberg PL *et al.*, 2012; Schanz J *et al.*, 2012). Kromě předchozích byly zohledněny další parametry jako hladina hemoglobinu, počet krevních destiček a neutrofilů a vliv chromosomových aberací na prognózu pacienta. IPSS-R rozděluje nemocné do pěti skupin podle skóre rizika, které je vypočteno na základě již zmíněných parametrů (Tab. 3,4; obr. 1).

**Tabulka 2:** Subtypy MDS podle WHO klasifikačního systému 2016 (Arber DA *et al.*, 2016)

Subtyp MDS	Dysplastická linie	Cytopenie <sup>a</sup>	% prstenčitých sideroblastů v KD	% blastů v KD	% blastů v PK	Cytogenetické abnormality
• MDS s jednou dysplastickou linií (MDS-SLD)	1	1-2	<15/<5 <sup>b</sup>	<5	<1	jakékoliv kromě izolované del(5q)
• MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD)	2-3	1-3	<15/<5 <sup>b</sup>	<5	<1	jakékoliv kromě izolované del(5q)
• MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS)						
MDS-RS s jednou dysplastickou linií (MDS-RS-SLD)	1	1-2	≥15/≥5 <sup>b</sup>	<5	<1	jakékoliv kromě izolované del(5q)
MDS-RS s multilineární dysplázií (MDS-RS-MLD)	2-3	1-3	≥15/≥5 <sup>b</sup>	<5	<1	jakékoliv kromě izolované del(5q)
• MDS s izolovanou del(5q)	1-3	1-2	-	<5	<1	izolovaná del(5q) nebo s jednou další abnormalitou kromě del(7q)/-7
• MDS s přebytkem blastů (MDS-EB)						
MDS-EB1	0-3	1-3	-	5-9	2-4	jakékoliv
MDS-EB2	0-3	1-3	-	10-19	5-19 nebo Auerovy tyče	jakékoliv
• MDS neklasifikovaný (MDS-U)						
S 1 % blastů v PK	1-3	1-3	-	<5	=1 <sup>d</sup>	jakékoliv
S jednou dysplastickou linií a pancytopenií	1	3	-	<5	<1	jakékoliv
Definován na základě cytogenetické abnormality	0	1-3	<15 <sup>c</sup>	<5	<1	MDS definující aberace
Dětská refrakterní cytopenie	1-3	1-3	0	<5	<2	jakékoliv

<sup>a</sup> Definice cytopenie: hemoglobin <10 g/dl, počet krevních destiček <100 × 10<sup>9</sup>/l, absolutní počet neutrofilů <1,8 × 10<sup>9</sup>/l, výjimečně může být u MDS mírná anémie nebo trombocytopenie nad těmito hranicemi. Monocyty v PK <1 × 10<sup>9</sup>/l

<sup>b</sup> pokud je přítomna mutace *SF3B1*

<sup>c</sup> případy s ≥15 % prstenčitých sideroblastů mají podle definice signifikantní erytroidní dysplázií a jsou klasifikovány jako MDS-RS-SLD

<sup>d</sup> 1 % blastů v PK musí být prokázáno minimálně při dvou odlišných příležitostech

**Tabulka 3:** Přehled prognostických parametrů a příslušných skórovacích hodnot podle IPSS-R (Greenberg PL *et al.*, 2012)

Hodnota prognostického parametru	0	0,5	1	1,5	2	3	4
<b>Cytogenetika</b>	Velmi dobrá	-	Dobrá	-	Střední	Špatná	Velmi špatná
<b>Počet blastů v KD (%)</b>	≤ 2	-	>2 - <5	-	5 - 10	> 10	-
<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	≥ 10	-	8 - <10	<8	-	-	-
<b>Krevní destičky (×10<sup>9</sup>/l)</b>	≥ 100	50 - <100	<50	-	-	-	-
<b>Neutrofily (×10<sup>9</sup>/l)</b>	≥ 0,8	< 0,8	-	-	-	-	-

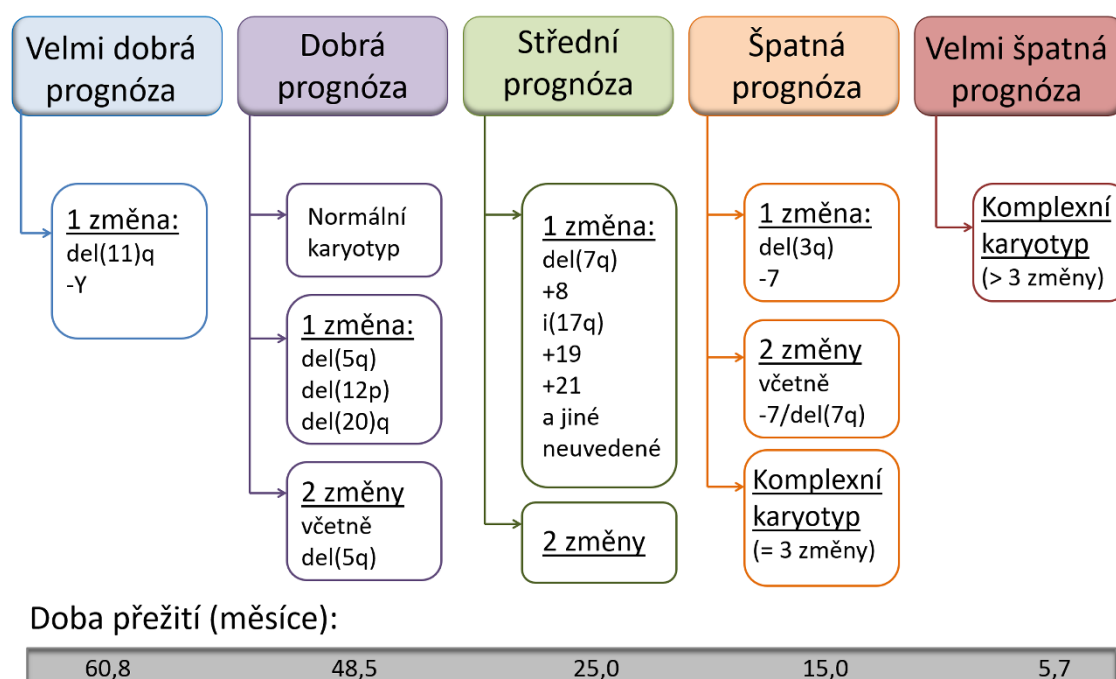
**Tabulka 4:** Kategorie rizik podle IPSS-R a jejich klinický význam (Greenberg PL *et al.*, 2012)

Kategorie rizik podle IPSS-R	Skóre	Přežití (roky)	AML transformace (roky)*
<b>Velmi nízké</b>	≤ 1,5	8,8	NR
<b>Nízké</b>	> 1,5 – 3	5,3	10,8
<b>Střední</b>	> 3 – 4,5	3,0	3,2
<b>Vysoké</b>	> 4,5 – 6	1,6	1,4
<b>Velmi vysoké</b>	> 6	0,8	0,7

\* Medián doby než u 25 % pacientů dojde k transformaci do AML

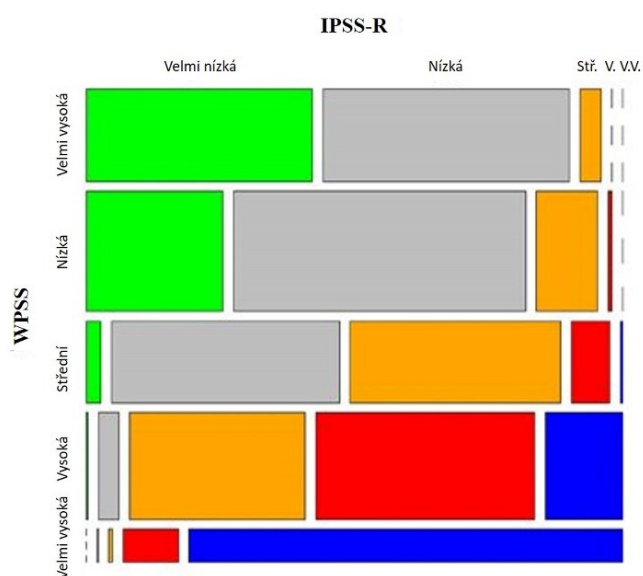
NR = kritérium nebylo dosaženo

**Obrázek 1:** IPSS-R podle cytogenetického nálezu (upraveno podle Schanz J *et al.*, 2011; Schanz J *et al.*, 2012)



Druhým v současnosti používaným skórovacím systémem je WPSS (WHO Classification-Based Prognostic Scoring System), který byl zveřejněn roku 2015 (Della Porta MG *et al.*, 2015; Červinek L, 2015). Systém rozděluje pacienty do pěti rizikových skupin a kromě jiného zohledňuje také závislost nemocného na podávání transfúzí. Oba zmíněné systémy jsou vhodné k určení prognózy pacienta a ve většině případů srovnatelné (Obr. 2). Volba skórovacího systému tak záleží na drobných rozdílech základního konceptu IPSS-R a WPSS a na klinických požadavcích.

**Obrázek 2:** Srovnání skórovacích systémů IPSS-R a WPSS (převzato z Della Porta MG *et al.*, 2015)



Horizontální osa zobrazuje kategorie IPSS-R a vertikální osa reprezentuje kategorie WPSS.

Prognostické skórovací systémy však nemohou být jediným kritériem při určení prognózy a volbě léčebného postupu pacientů. Průběh onemocnění je velmi heterogenní a zároveň je třeba zvážit i další faktory jako jsou věk, funkční status, komorbidity, nutriční status a psychický stav pacienta (Červinek L, 2015).

### 1.1.3 Léčba

Alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (ASCT; allogenic stem cell transplantation) je v současné době jedinou terapií, která u pacientů s MDS může vést k vyléčení onemocnění (Steensma DP, 2018; Čermák J, 2019; Weinberg OK a Hasserjian RP, 2019). Cílem terapie jinými léčivy je především redukce symptomů spojených s nemocí, snížení rizika progresu choroby, zlepšení kvality a prodloužení

života. Mezi nejčastěji užívané schválené léky dnes patří dva typy preparátů, a to imunomodulační (lenalidomid) a hypometylační látky (HMA; azacytidin, decitabin). Rozhodnutí o typu léčby u nemocných závisí především na zařazení pacienta do rizikové skupiny. Kromě toho je nutné při výběru léčby zvážit i další faktory jako jsou věk, závažnost projevů onemocnění a případné komorbidity.

#### 1.1.3.1 *MDS s nízkým rizikem*

U asymptomatických pacientů s raným stádiem onemocnění se doporučuje pouze sledování nemocného bez léčebných procedur (Steensma DP, 2018). Nebylo prokázáno, že by léčba v takto raných stádiích onemocnění přispívala k prevenci klonální evoluce nebo progresi onemocnění. Zpravidla je terapie u pacienta zahájena v době, kdy dojde ke zhoršení cytopenie nebo se objeví typické symptomy nemoci.

Pro rozhodnutí o typu léčby je třeba posoudit dva základní parametry. Na základě hladiny erythropoetinu v séru lze předpokládat úspěšnost odpovědi pacienta na terapii faktory stimulujícími erytropoézu (Hellström-Lindberg E *et al.*, 2003). Dále přítomnost izolované del(5q) v karyotypu je asociována s dobrou odpovědí nemocných na léčbu lenalidomidem (List A *et al.*, 2006; Fenaux P *et al.*, 2011). Až 70 % pacientů s izolovanou del(5q) dosáhne po léčbě lenalidomidem transfúzní nezávislosti a až 40 % nemocných se dostane do cytogenetické remise. V rámci české MDS skupiny dosáhlo po léčbě lenalidomidem 91 % pacientů kompletní transfúzní nezávislosti (Jonasova A *et al.*, 2018).

U mnoha pacientů však časem léčba selhává a nemoc progreduje (Steensma DP, 2018). V takovém případě je zpravidla nasazena imunosupresivní terapie nebo HMA.

#### 1.1.3.2 *MDS s vysokým rizikem*

U nemocných zařazených do skupiny s vysokým rizikem progresi onemocnění do AML je třeba nejdříve zvážit ASCT (Steensma DP, 2018). Zároveň je nutné posoudit současnou fitness pacienta vzhledem k jeho věku a rizika spojená s transplantací, tedy dlouhodobou imunosupresi a nebezpečí reakce štěpu proti hostiteli (Červínek L, 2015; Steensma DP, 2018; Čermák J, 2019).

Před případnou transplantací se zpravidla zařazuje cytoredukční léčba (Brierley CK a Steensma DP, 2016; Steensma DP, 2018). Dříve byla používána chemoterapie, ale v současnosti se využívá především HMA (Gerds AT *et al.*, 2012; Červinek L, 2015; Čermák J, 2019). Dlouhodobé přežití pacientů po ASCT se pohybuje mezi 30-40 % s minimálně 30% rizikem relapsu choroby (Bělohávková P, 2016)

U nemocných, kteří nejsou vhodnými kandidáty na transplantaci je nasazena léčba HMA (Steensma DP, 2018). Ve srovnání se skupinami nemocných léčených intenzivní chemoterapií, nízkými dávkami cytarabinu nebo podpůrnou léčbou mají pacienti léčení HMA lepší celkové přežití, 24 proti 15 měsícům (Zwierzina H *et al.*, 2005; Fenaux P *et al.*, 2009). Nicméně dlouhodobé výsledky ukazují, že i přes pozitivní efekt HMA na délku přežití, žije déle než tři roky pouze 15–26 % nemocných (Koreth J *et al.*, 2013; Cermak J *et al.*, 2018). Vhodné dávkování a časový plán podávání nejsou dosud pevně stanoveny a podobně mechanismus účinku HMA zatím není zcela objasněn (Steensma DP, 2018). Léčba HMA je často ordinována proto, že účinně snižuje procentuální zastoupení patologických buněk a zlepšuje funkci KD, přesto ale není schopna zcela eliminovat transformované kmenové buňky a po nějaké době dochází k relapsu onemocnění (Jonášová A, 2018). V případě selhání léčby HMA není dosud další léčebný postup zcela jasný (Steensma DP, 2018). Pacienti se zařazují do aktuálních studií, které často využívají kombinace zmíněných léčiv. Velmi nadějně jsou guadecitabin a rigosertib, které jsou v současnosti ve fázi klinické studie (Issa JP *et al.*, 2015; Garcia-Manero G *et al.*, 2016; Jonášová A, 2018).

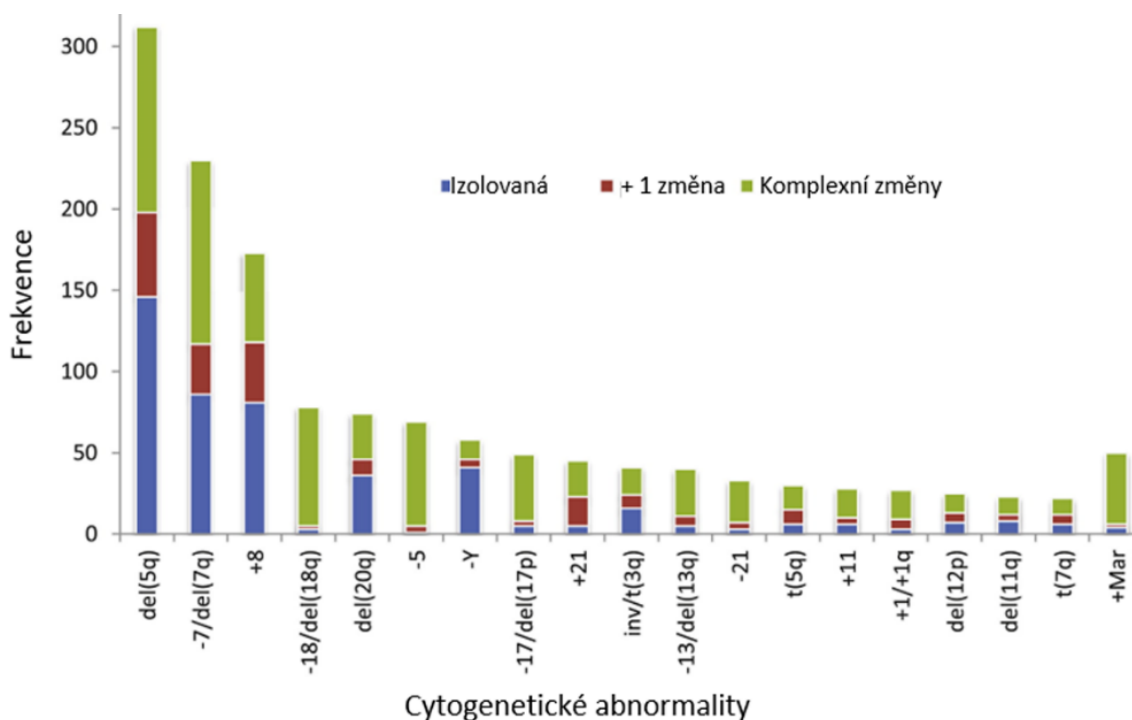
#### 1.1.3.3 Podpůrná terapie

Kromě výše zmíněných preparátů je součástí léčby také snaha o zmírnění projevů spojených s onemocněním (Steensma DP, 2018). Kromě léčiv stimulujících erytropoézu, se používají ke zlepšení hodnot červenýchrvinek transfúze. Pravidelné podávání transfúzí je však spojeno s rizikem akumulace železa, je tedy třeba tyto hodnoty sledovat a v případě potřeby nasadit chelatační léčbu pro odstranění přebytečného železa z organismu (Steensma DP a Gattermann N, 2013; Steensma DP, 2018). Stejně jako u nemocných s anémií i u pacientů s trombocytopenií a/nebo neutropenií se využívá látek stimulujících trombopoézu a/nebo myeloidních růstových faktorů (Steensma DP, 2018).

## 1.2 Cytogenetické a molekulárně-genetické změny u MDS

Chromosomové aberace jsou popisovány přibližně u 50 % pacientů s primárními MDS a až u 80 % nemocných se sekundárními MDS (Le Beau MM *et al.*, 1986; Solé F *et al.*, 2000; Solé F *et al.*, 2005). Balancované změny (reciproké translokace, inverze, inserce) jsou typicky popisovány spíše u myeloidních leukémií jako AML nebo chronická myeloidní leukémie, ale u diagnózy MDS jsou poměrně vzácné (Obr. 3; Haase D *et al.*, 2007; Giagounidis A a Haase D, 2013). Běžným nálezem u MDS jsou spíše nebalancované chromosomové aberace, tedy ztráty a zisky genetického materiálu.

**Obrázek 3:** Frekvence klonálních chromosomových aberací u pacientů s MDS (převzato z Giagounidis A a Haase D, 2013)



### 1.2.1 Ztráta heterozygosity

#### 1.2.1.1 Delece

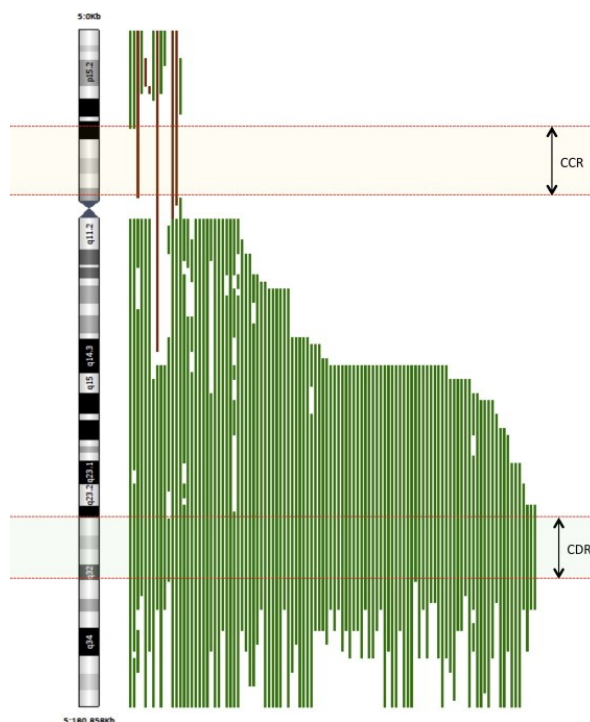
Mezi nejčastěji detekované chromosomové aberace patří del(5q) (Haase D *et al.*, 2007; Haase D, 2008). Del(5q) je popisována přibližně u 30 % pacientů s *de novo* MDS a její rozsah je velmi variabilní (Obr. 4; Haase D *et al.*, 2007; Haase D, 2008; Zemanova

Z *et al.*, 2014). Mezi známé obvykle deletované oblasti (CDR; commonly deleted region) patří 5q31 a 5q32-q33. Proximální oblast 5q31.1-5q31.2 je pravděpodobně asociována s MDS vysokého rizika, naopak distální oblast 5q32-5q33 je považována za změnu typickou pro subtyp MDS s izolovanou del(5q) s dobrou prognózou (Haase D *et al.*, 2007; Haase D, 2008; Boultonwood J *et al.*, 2010; Zemanova Z *et al.*, 2014). Nicméně až 95 % pacientů s diagnózou MDS mívá deletované obě CDR (Ebert BL, 2011; Jerez A *et al.*, 2012a). V průběhu let byla popsána celá řada kandidátních genů vyskytujících se v této oblasti, u kterých se předpokládalo, že jejich haploinsuficience může vést k rozvoji choroby, dodnes však žádný z nich nebyl potvrzen (Boultonwood J *et al.*, 2010; Zemanova Z *et al.*, 2014). Proto se předpokládá, že při vzniku choroby kooperuje několik genů vyskytujících se v těchto oblastech. Jsou však známy případy nemocných s diagnózou MDS, u nichž se vyskytly atypické del(5q), které nezahrnují běžně deletované lokusy (Brezinova J *et al.*, 2012). Pacienti s izolovanou del(5q) nebo del(5q) s jednou další změnou mají obecně dobrou prognózu, pokud se však k těmto změnám přidávají další aberace prognóza se výrazně zhoršuje (Schanz J *et al.*, 2011; Schanz J *et al.*, 2012). Pokud je deletovaný chromosom 5 zahrnut do komplexních karyotypů/přestaveb chromosomů mají nemocní extrémně špatnou prognózu s celkovým přežitím dva měsíce (Zemanova Z *et al.*, 2014).

Zhruba u 10 % pacientů je popisována delece dlouhých ramen chromosomu 7 – del(7q) nebo monosomie chromosomu 7, ať už jako samostatná změna nebo jako součást komplexních karyotypů (Bejar R *et al.*, 2011a). Jerez a kolektiv identifikovali tři CDR – 7q22, 7q34 a 7q35q36 a celou řadu souvisejících kandidátních genů (Obr. 5; Jerez A *et al.*, 2012b). U genů *EZH2* (7q36.1) a *RABL5* (7q22.1) zaznamenali signifikantní snížení exprese i u vzorků pacientů bez aberace del(7q)/-7. Předpokládají tedy, že ztráta heterozygoty nemusí být jediným mechanismem ovlivňujícím patologii MDS. Izolovaná del(7q) je řazena do skupiny se střední prognózou, pokud se však k del(7q) přidruží další změna nebo je popsána monosomie 7 prognóza se zhoršuje (Schanz J *et al.*, 2011; Schanz J *et al.*, 2012). Del(7q)/-7 v souvislosti s komplexními aberacemi představuje velmi špatnou prognózu s celkovým přežitím zhruba pět měsíců.

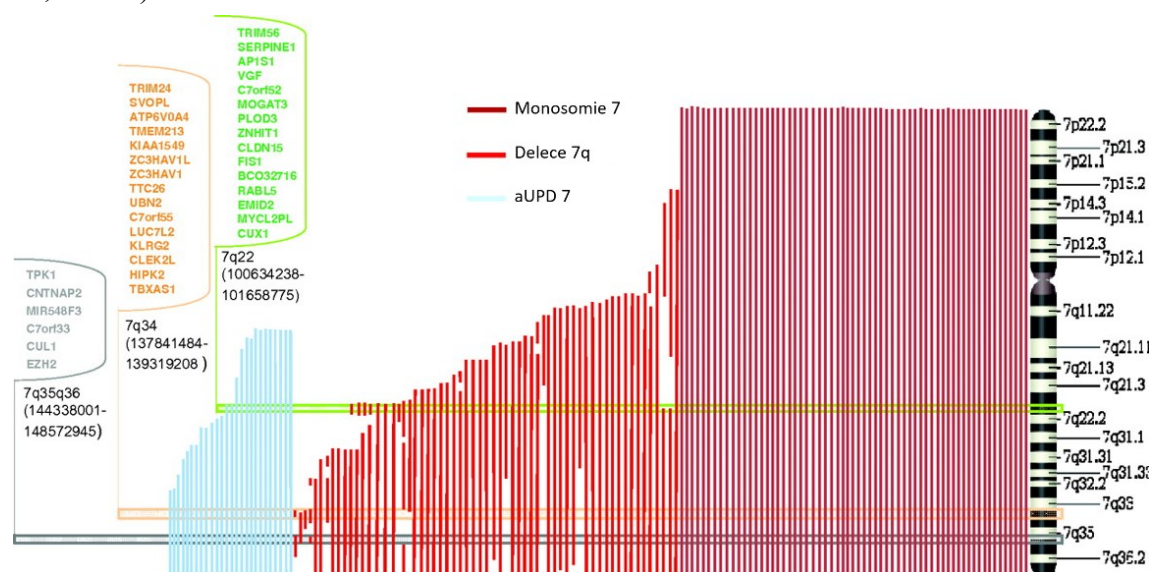


**Obrázek 4:** Distribuce nebalancovaných změn na chromosomu 5 identifikovaných metodou mikročipů (převzato ze Zemanova Z *et al.*, 2014)



Zeleně jsou znázorněny ztráty a červeně zisky genetického materiálu. CCR (commonly retained region) je společná zachovaná oblast v rozsahu 5p11.1-p14.2. CDR (commonly deleted region) je společná deletovaná oblast v rozsahu 5q31.1-5q32.

**Obrázek 5:** Identifikace kandidátních genů na dlouhých ramenech chromosomu 7 mapováním společných deletovaných oblastí pomocí mikročipů (převzato z Jerez A *et al.*, 2012b)



Zelený, oranžový a šedý obdélník označují společné deletované oblasti s vypsányými kandidátními geny

Delece dlouhých ramen chromosomu 20 - del(20q) je další poměrně častou změnou u MDS, incidence 2-5 % (Haase D *et al.*, 2007; White NJ *et al.*, 1994; Haddad A *et al.*, 2008). Většinou je intersticiální a v rozsahu velmi variabilní. Proximální zlom aberace del(20q) je zpravidla lokalizován v pruhu 20q11.21-20q12 a distální se pohybuje v rozmezí od 20q13.13 do 20q13.33 (Wu C *et al.*, 2015). Del(20q) jako samostatná abnormalita v karyotypu je spojena s dobrou prognózou (Schanz J *et al.*, 2011; Schanz J *et al.*, 2012). V souvislosti s del(20q) byla až u 53 % případů dokumentována ztráta nebo částečná delece genu *ASXL1* (20q11.21), přičemž obecně mutace tohoto genu zkracují celkové přežití nemocných (Abdel-Wahab O *et al.*, 2012; Brezinova J *et al.*, 2014; Brezinova J *et al.*, 2019).

Další rekurentní aberací je ztráta chromosomu Y (Wong AK *et al.*, 2008). Ztráta chromosomu Y je u mužů poměrně běžným fenoménem často spojovaným s přibývajícím věkem (UKCCG, 1992). Incidence tohoto nálezu tedy s věkem stoupá stejně jako výskyt MDS (Wong AK *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že u mužů s hematologickou diagnózou je procentuální zastoupení ztráty chromosomu Y ve vzorku výrazně vyšší než u mužů stejného věku bez hematologického onemocnění (Wiktor A *et al.*, 2000). Wiktorová a kol. předpokládali, že pokud je procentuální zastoupení ztráty chromosomu Y ve vzorku vyšší než 75 % jde o změnu asociovanou s probíhající chorobou. Novější studie však tuto hypotézu nepotvrdily ani nevyvrátily a v současné době zůstává nejasné, zda je ztráta chromosomu Y přímo asociována se vznikem a patogenezí MDS či nikoliv (Wiktor AE *et al.*, 2011). Izolovaná ztráta chromosomu Y je v současné době řazena do skupiny s dobrou prognózou (Schanz J *et al.*, 2011; Schanz J *et al.*, 2012).

#### 1.2.1.2 *Získaná uniparentální disomie*

Uniparentální disomie (UPD) je stav, kdy obě kopie určitého chromosomu nebo jeho části pochází od jednoho rodiče. Jde tedy o balancovanou změnu, při které dochází ke ztrátě heterozygoty, ale nikoliv ke změně počtu kopií DNA.

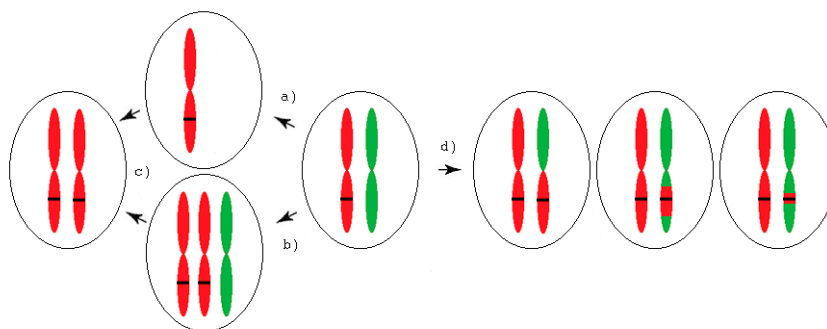
Vrozená UPD vzniká během zárodečného vývoje a všechny buňky vznikajícího organismu tak následně nesou stejnou změnu. Tento stav může mít za následek klinické projevy vrozených vývojových poruch, jehož příčinou je zpravidla odlišný maternální či paternální imprinting (Angelmanův syndrom, Prader-Willi syndrom). Vrozená UPD je

však v populaci poměrně běžnou změnou a pokud nezasahuje do kódující oblasti DNA nepůsobuje nositeli žádné projevy onemocnění.

Získaná uniparentální disomie (aUPD), jinak také označovaná jako CN-LOH (copy number neutral loss of heterozygosity), je změna, která vzniká pouze v části somatických buněk během mitotického dělení v průběhu života a může být příčinou vzniku nebo progresu onemocnění. Patologický potenciál aUPD spočívá v přítomnosti mutací tumor-supresorových genů nebo onkogenů, imprintovaných genů, hyper- nebo hypometylovaných genů, deacetylovaných genů, případně ve ztrátě malých úseků obsahujících kauzální geny.

UPD může vzniknout několika různými mechanismy (Obr. 6; Tuna M *et al.*, 2009). Chybnou segregací v mitose nebo meiose dojde k trisomii nebo monosomii jednoho chromosomu. Během následného dělení se nadbytečný chromosom vyřadí nebo naopak u zbývajících chromosomů dojde k jeho zdvojení a vzniká tak UPD celého chromosomu. Ke vzniku segmentální UPD dochází pravděpodobně prostřednictvím jedné či více mitotických rekombinací nebo během oprav dvouřetězcových zlomů DNA.

**Obrázek 6:** Mechanismy vzniku UPD (převzato a upraveno Tuna M *et al.*, 2009)



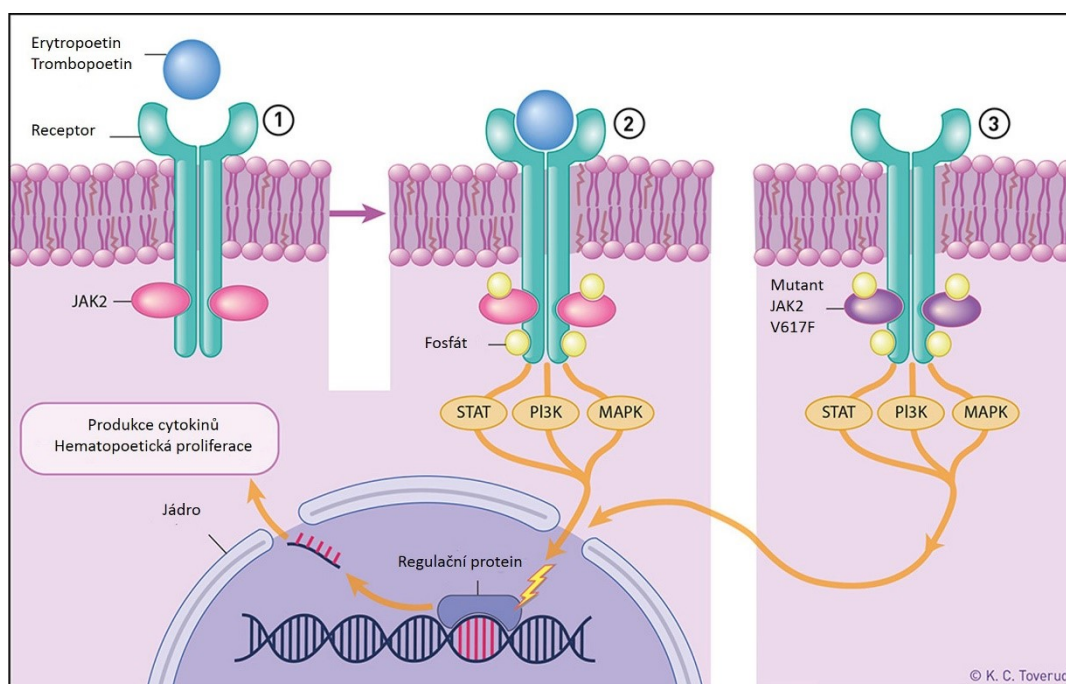
Černý pruh označuje mutaci genu. **a)** Monosomie (chromosom se „opozdí“ při rozchodu do dceřiné buňky), **b)** Trisomie (chybná segregace), **c)** UPD celého chromosomu (ztráta nadbytečného nebo zdvojení zbývajících chromosomů), **d)** segmentální UPD (jedna či více mitotických rekombinací).

Jednou z prvních popsanych aUPD u hematoonkologických onemocnění byla změna na krátkých ramenech chromosomu 9 (Kralovics R *et al.*, 2002; Kralovics R *et al.*, 2003; Kralovics R *et al.*, 2005). aUPD 9p byla pozorována až u 33 % pacientů s onemocněním polycythaemia vera a je spojena s výskytem homozygotní mutace genu JAK2 V617F. Záměna vysoce konzervativního valinu za fenylalanin je

v hematopoetických kmenových buňkách příčinou konstitutivní aktivace cytoplazmatické tyrozin kinázy JAK2 (Obr. 7). Trvalá aktivace signální dráhy JAK-STAT poskytuje hematopoetickým buňkám proliferační výhodu.

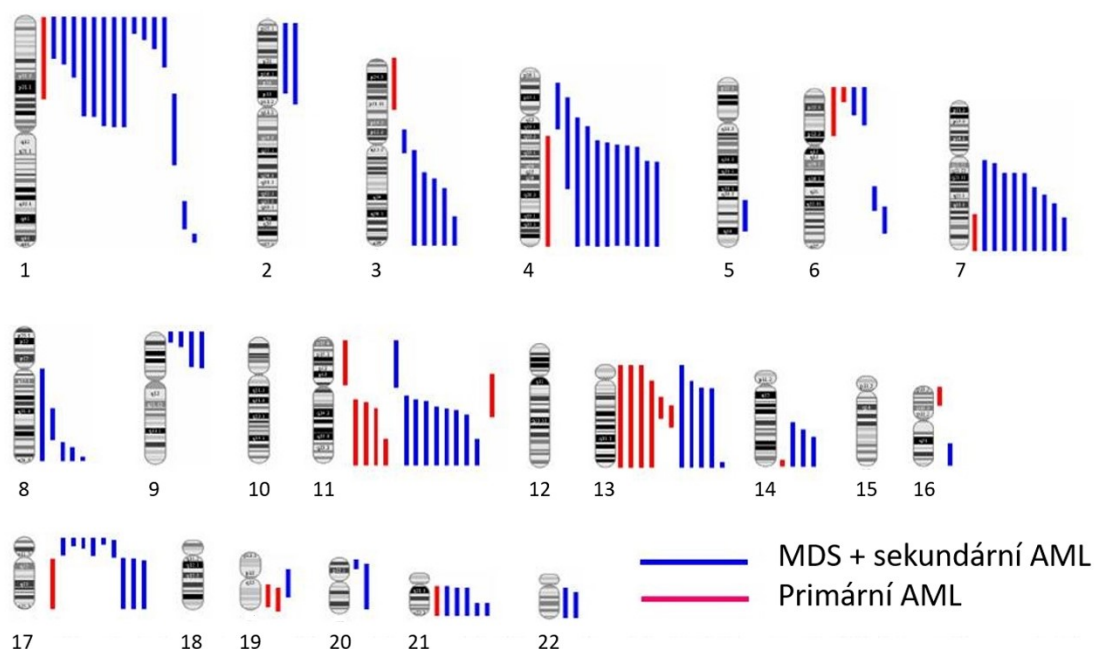
U MDS se aUPD vyskytuje zhruba v 18–33 % případů (Dunbar AJ *et al.*, 2008; O’Keefe C *et al.*, 2010; Makishima H a Maciejewski JP, 2011). Jejich rozmístění v genomu není náhodné a mezi nejčastější a pravděpodobně i prognosticky významné patří aUPD 1p, 4q, 7q, 11q, 13q, 17p, 19q a 21q (Obr. 8; Raghavan M *et al.*, 2005; Fitzgibbon J *et al.*, 2005; Dunbar AJ *et al.*, 2008; Szpurka H *et al.*, 2009; Jankowska AM *et al.*, 2009; Langemeijer SMC *et al.*, 2009; Ernst T *et al.*, 2010; Jasek M *et al.*, 2010; O’Keefe C *et al.*, 2010). aUPD ve zmíněných oblastech a s nimi asociované homozygotní genové mutace jsou obecně spojeny s horší prognózou (Tab. 5).

**Obrázek 7:** JAK-STAT signalizace (převzato z Ghanima W *et al.*, 2013)



JAK2 je cytoplazmatická tyrozin kináza, která je součástí signální dráhy JAK-STAT. K aktivaci receptoru signální dráhy dochází při vazbě erythropoetinu nebo trombopoetinu na extracelulární doménu receptoru (1). Aktivace receptoru vede k jeho konformační změně, vazbě fosfátu a aktivaci intracytoplazmatické části receptoru (2). Tato změna následně aktivuje druhé posly STAT, PI3K a MAPK. V buňkách s mutovanou JAK2 kinázou je dráha konstitutivně aktivována bez nutnosti vazby ligandu na receptor (3).

**Obrázek 8:** Rozmístění aUPD v genomu pacientů s diagnózou MDS a primární/sekundární AML (převzato O'Keefe C *et al.*, 2010).



**Tabulka 5:** Přehled rekurentních aUPD a s nimi asociovaných homozygotních genových mutací identifikovaných u pacientů s MDS a AML

aUPD	Mutace v genu	Lokalizace genu	Reference
1p	<i>MPL</i>	1p34.2	Szpurka H <i>et al.</i> , 2009
4q	<i>TET2</i>	4q24	Jankowska AM <i>et al.</i> , 2009; Langemeijer SMC <i>et al.</i> , 2009
7q	<i>EZH2</i>	7q36.1	Ernst T <i>et al.</i> , 2010
11q	<i>c-CBL</i>	11q23.3	Dunbar AJ <i>et al.</i> , 2008; Grand FH <i>et al.</i> , 2009; Barresi V <i>et al.</i> , 2010
13q	<i>FLT3</i>	13q12.2	Fitzgibbon J <i>et al.</i> , 2005
17p	<i>TP53</i>	17p13.1	Jasek M <i>et al.</i> , 2010
19q	<i>CEBPA</i>	19q13.1	Raghavan M <i>et al.</i> , 2005
21q	<i>RUNX1</i>	21q22.3	Fitzgibbon J <i>et al.</i> , 2005

### 1.2.2 Zisk/amplifikace

Mezi nejčastější nebalancované změny spojené se ziskem genetického materiálu u MDS patří trisomie chromosomu 8 (Brunning RD *et al.*, 2008). Vyskytuje se jako izolovaná změna u 11 % pacientů s abnormálním karyotypem a celkově zhruba u 5 % nemocných s diagnózou MDS (Paulsson K a Johansson B, 2007; Schanz J *et al.*, 2011). Nález trisomie 8 však sám o sobě diagnózu MDS nepotvrzuje (Brunning RD *et al.*, 2008). Velmi vzácně byl u zdravé populace prokázán vrozený mozaicismus trisomie 8

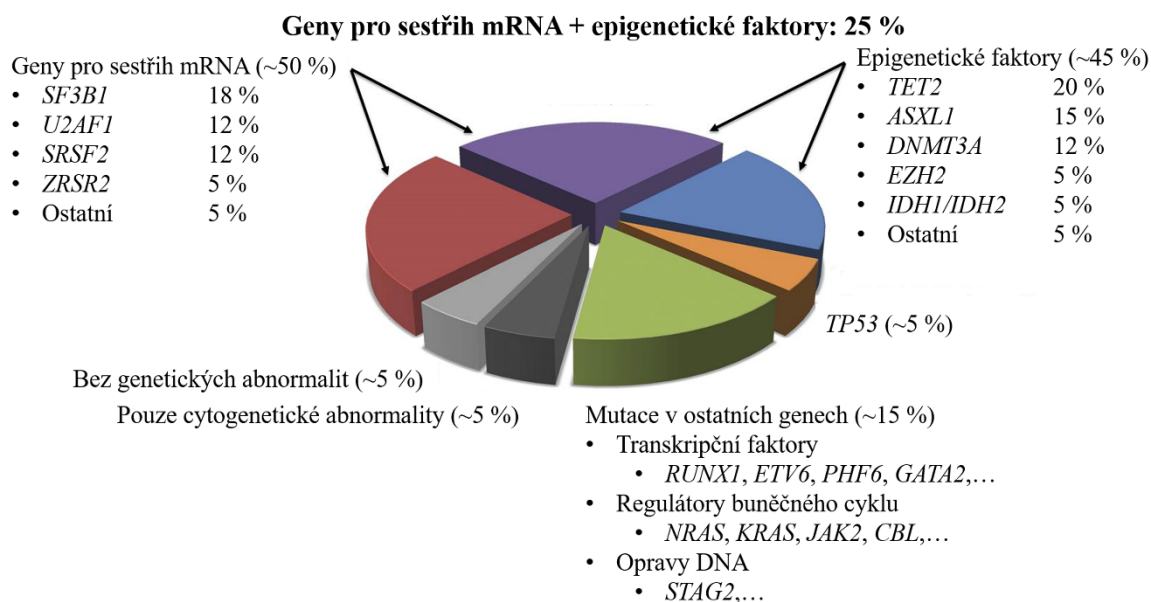
bez klinických projevů, jehož výskyt je obecně u myeloidních neoplázií pravděpodobně vyšší (Nielsen J a Wohler M, 1991; Seghezzi L *et al.*, 1996; Maserati E *et al.*, 2002). Maseratiová a kol. uvádí incidenci vrozené trisomie 8 u hematologických malignit mezi 15 až 20 %, jde však o výsledky analýzy vzorků 14 pacientů (Maserati E *et al.*, 2002). Naopak Saumellová a kolegové v souboru čítajícím 32 nemocných prokázala vrozenou trisomii 8 pouze u jednoho pacienta a předpokládá, že většina těchto aberací je u MDS charakteru získaných (Saumell S *et al.*, 2015). Vzhledem k nízkému počtu nemocných ve studiích a nejednoznačnosti germinálního původu trisomie 8 je proto pro diagnózu MDS třeba, aby byla zároveň splněna i morfologická kritéria dysplázie (Brunner RD *et al.*, 2008). Prognostický význam této změny byl dlouho nejasný. Saumellová a kolegové ve studii zahrnující 257 nemocných zjistili, že trisomie 8 splňuje kritéria kategorie se střední prognózou (Saumell S *et al.*, 2012). Pozorovali, že pacienti, kteří mají méně než 5 % blastů a samostatnou trisomii 8 mají stejnou prognózu jako nemocní s normálním karyotypem, pokud však počet blastů překročí 5 % je prognóza horší. Podobně nemocní s další jednou nebo dvěma aberacemi měli celkové přežití srovnatelné s pacienty s izolovanou trisomií 8.

Trisomie 8 je spolu s del(5q) nejčastější změnou u pacientů s nepříbuznými klony (Johansson B *et al.*, 1999; Schanz J *et al.*, 2018a). Až u 35 % pacientů s nepříbuznými klony je prokázána v jedné klonální linii izolovaná del(5q) a ve druhé samostatná trisomie 8. Ve většině případů je klonální zastoupení del(5q) v KD výrazně vyšší než u trisomie 8 a zdá se, že jde o možnou podskupinu MDS s izolovanou del(5q) (Neuwirtová R *et al.*, 2014; Jonasova A *et al.*, 2018). Nemocní velmi dobře odpovídají na léčbu lenalidomidem a mají příznivé dlouhodobé přežití.

### 1.2.3 Mutace

S rozvojem metod molekulární genetiky přišlo výrazné rozšíření znalostí patogeneze MDS. Zavedením sekvenace nové generace (NGS) bylo zjištěno, že kolem 80 % pacientů s *de novo* MDS má somatické mutace v genech souvisejících s rozvojem onemocnění, s mediánem tři mutace na jednoho nemocného (Bejar R *et al.*, 2011b; Papaemmanuil E *et al.*, 2013; Haferlach T *et al.*, 2014). Mutované geny se v současnosti dělí do tří kategorií: geny související se sestřihem mRNA, epigenetické faktory a geny pro DNA transkripci/signální transdukcii (Obr. 9; Shallis RM *et al.*, 2018).

**Obrázek 9:** Distribuce rekurentních mutací u MDS (upraveno podle Bejar R a Steensma DP, 2014)



Přibližně 50 % pacientů s MDS má mutaci v genech pro sestřih mRNA a zhruba podobné procento má mutaci v jednom či více genech pro epigenetické faktory. Kolem 25 % nemocných má mutace v genech obou těchto skupin. Pacienti s mutací *TP53* mají vysokou míru výskytu cytogenetických abnormalit, zejména komplexních chromosomových změn. Asi 15 % nemocných má mutace v jiných genech než sestřihových a epigenetických. Kolem 10 % nemocných nemá žádné známé mutace.

Jednoznačně nejpočetnější skupinou jsou geny související se sestřihem mRNA (Shallis RM *et al.*, 2018). Zejména jde o klíčové proteiny spliceozómu, jehož poškození vede k chybnému sestřihu RNA a syntéze abnormálních proteinů. První mutace tohoto typu byla popsána u genu *SF3B1* a to v 20-28 % případů (Papaemmanuil E *et al.*, 2011; Malcovati L *et al.*, 2011). Mutace *SF3B1* jsou typicky jednonukleotidové záměny v exonech 12-15 a jsou silně asociovány s výskytem prstenčitých sideroblastů (Papaemmanuil E *et al.*, 2011). U diagnóz MDS-RS a MDS-MLD s prstenčitými sideroblasty je incidence mutace *SF3B1* mezi 65-81 %, naopak u ostatních subtypů se výskyt pohybuje kolem 10 % (Papaemmanuil E *et al.*, 2011; Malcovati L *et al.*, 2015). Mutace *SF3B1* je spojena s nižšími stupni cytopenie, lepším celkovým přežitím, nižším rizikem transformace do AML a delší dobou přežití bez progresu onemocnění (Papaemmanuil E *et al.*, 2011). Je také zároveň jedinou mutací, jejíž prognostický význam je zohledněn v novém WHO klasifikačním systému 2016 (Arber DA *et al.*, 2016). V případech, kdy je detekována mutace *SF3B1*, je doporučeno diagnostikovat MDS-RS. MDS-RS s mutací *SF3B1* mají zároveň lepší prognózu než MDS-RS bez



mutace. Mezi další geny RNA sestřihu, které jsou opakovaně mutované u MDS patří *SRSF2*, *U2AF1* a *ZRSR2* (Yoshida K *et al.*, 2011). Obecně mutace genů RNA sestřihu představují více než polovinu somatických mutací u MDS. S výjimkou již zmíněného genu *SF3B1* mají tyto mutace zpravidla horší prognózu nebo jako v případě *ZRSR2* neznámou (Shallis RM *et al.*, 2018).

Druhou početnou skupinou jsou mutace genů pro epigenetické faktory, které ovlivňují buď DNA metylaci (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/IDH2*) nebo modifikaci histonů (*ASXL1*, *EZH2*) (Shallis RM *et al.*, 2018). Jedním z prvních objevených genů, jejichž mutace byla asociována s myeloidními neopláziemi, byl *TET2*, který katalyzuje CpG demetylaci metylcytozinu na 5-hydroxymethylcytozin (Langemeijer SMC *et al.*, 2009; Ito S *et al.*, 2010). U MDS je incidence uváděna kolem 22 %. Zároveň bylo zjištěno, že až u 26 % případů s mutací *TET2* je zasažena i druhá alela genu a dochází tak ke ztrátě funkce obou alel (Delhommeau F *et al.*, 2009; Bejar R *et al.*, 2011b). Nebyla prokázána souvislost mutace *TET2* s prognózou, ale je asociována s lepší odpovědí na léčbu HMA (Itzykson R *et al.*, 2011; Bejar R *et al.*, 2014). Mutace v ostatních zmíněných genech souvisejících s epigenetickými modifikacemi jsou spojeny s horším celkovým přežitím pacientů a vysokým rizikem transformace do AML, výjimkou jsou geny *IDH1/IDH2* (Shallis RM *et al.*, 2018). Mutace genů *IDH1/IDH2* jsou přítomny zhruba u 5 % případů MDS a jsou asociovány s mutacemi dalších epigenetických regulátorů (*DNMT3A*, *ASXL1*) a genu *SRSF2* (Lin C *et al.*, 2014; DiNardo CD *et al.*, 2016). Jejich prognostický význam je i přes rozsáhlé studie nejasný.

Třetí skupina spojuje dohromady geny pro transkripční faktory (*RUNX1*, *ETV6*), regulátory transkripce (*TP53*) a buněčného cyklu (*NRAS*, *SETBP1*) (Shallis RM *et al.*, 2018). Nejčastěji mutovaným transkripčním faktorem je *RUNX1* (5-9 %) a společně s mutacemi *ETV6* genu jsou indikátory krátkého celkového přežití (Bejar R *et al.*, 2011b; Sakurai H *et al.*, 2017). Mezi nejčastěji mutované regulátory transkripce u MDS patří jednoznačně gen *TP53* (8-13 %), jehož incidence výrazně stoupá u vysoce rizikových subtypů MDS (Bejar R *et al.*, 2011b; Shallis RM *et al.*, 2018). *TP53* je asociován s komplexním karyotypem a je negativním nezávislým prognostickým faktorem pro celkovou dobu přežití a riziko transformace do AML bez ohledu na prognostickou kategorizaci IPSS-R (Preudhomme C *et al.*, 1994; Lai JL *et al.*, 1995; Soenen V *et al.*, 1998; Bejar R *et al.*, 2011b; Svobodova K *et al.*, 2016; Shallis RM *et al.*, 2018). Zdá se, že mutace tohoto genu nemají žádný vliv na léčbu azacytidinem a dokonce u nemocných s mutací byla pozorována 100% odpověď na léčbu decitabinem



(Bally C *et al.*, 2014; Welch JS *et al.*, 2016). Normální buněčná proliferace a diferenciace je regulována zejména prostřednictvím MAP kináz a PI3 kináz, které jsou centrálně aktivovány skupinou proteinů RAS (Downward J, 2003; Akutagawa J *et al.*, 2016). Mezi protoonkogeny skupiny RAS patří i *NRAS*, který je mutován zhruba u 4-6 % případů MDS a je spojen se zvýšeným počtem myeloblastů v KD, horším celkovým přežitím a zvýšeným rizikem transformace do AML (Bacher U *et al.*, 2007; Bejar R *et al.*, 2011b). Podobně je tomu u genu *SETBP1*, který je kromě jiného asociován také se současným výskytem dalších somatických mutací a cytogenetických aberací, zejména s mutacemi genu *ASXL1* a del(7q) (Damm F *et al.*, 2013; Fernandez-Mercado M *et al.*, 2013; Makishima H *et al.*, 2013).

Mutační stav genů není zatím v klinické praxi běžně vyšetřován. Probíhá však rozsáhlý mezinárodní výzkum a ukazuje se, že u mnoha případů je znalost somatických mutací velkým přínosem. V souvislosti s narůstajícím počtem nalezených mutací v kauzálních genech dochází ke zhoršení prognózy nemocných, a proto by měla být jejich analýza zařazena do rutinního vyšetření. V současné době je připravován i nový prognostický skórovací systém IPSS-Rm (The Revised International Prognostic Scoring System „Molecular“), ve kterém již budou mutace genů zohledněny (Nazha A *et al.*, 2015a).

### 1.3 Klonální vývoj

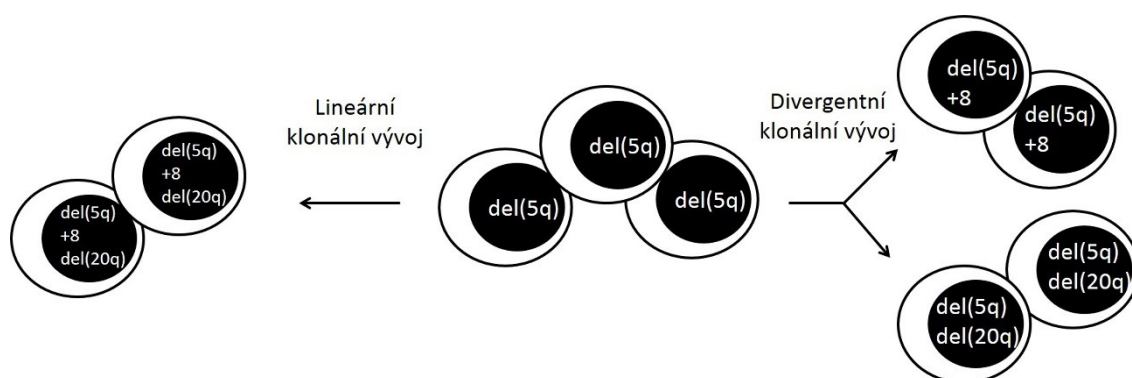
Vznik a vývoj onkologických onemocnění je obecně velmi dynamický proces spojený s postupnou akumulací mutací, které poskytují patologickým buňkám růstovou výhodu a zvyšují maligní charakter choroby.

Klonální vývoj je charakterizován jako víceúrovňový proces, při kterém dochází k zisku aberací u pacienta s původně normálním karyotypem nebo k zisku dalších změn u nemocného, jehož karyotyp byl již v době diagnózy abnormální (Bernasconi P *et al.*, 2010). Evoluce patologického klonu je popisována v 8–39 % všech MDS diagnóz a je asociována s krátkým celkovým přežitím a vysokým rizikem transformace do AML (Horiike S *et al.*, 1988; White AD *et al.*, 1994; Tien H-F *et al.*, 1995; Haase D *et al.*, 2007; Wang H *et al.*, 2010; Bernasconi P *et al.*, 2010; Neukirchen J *et al.*, 2017; Schanz J *et al.*, 2018b; Feurstein S *et al.*, 2018).

Rozlišujeme lineární a divergentní klonální vývoj (Obr. 10; Grove CS a Vassiliou GS, 2014; da Silva-Coelho P *et al.*, 2017). Lineární klonální vývoj je

charakteristický ziskem nových chromosomových aberací nebo mutací v čase, tedy mezi jednotlivými odběry KD pacienta. Divergentní klonální vývoj je typický přítomností více příbuzných klonů v jednom odběru pacienta. Tyto subklony mají některé aberace společné a část změn se vyskytuje vždy pouze v jednom z klonů. Se vzrůstající heterogenitou klonů je obtížnější stanovit vhodnou léčbu pacienta a u subklonů se zvyšuje riziko rezistence na specifickou terapii. Schanzová a kolegové potvrdili, že u pacientů s divergentním klonálním vývojem je medián celkového přežití kratší než u nemocných s lineárním klonálním vývojem (11 vs. 33 měsíců) (Schanz J *et al.*, 2018b). Podobně pacienti, u kterých došlo ke klonálnímu vývoji již v prvním roce od diagnózy mají horší celkové přežití ve srovnání s nemocnými, u kterých byla evoluce klonu zaznamenána až po 12 měsících od diagnózy (Neukirchen J *et al.*, 2017; Schanz J *et al.*, 2018b).

**Obrázek 10:** Schématické znázornění zisku nových chromosomových změn u lineárního a divergentního klonálního vývoje



Stabilní genetické změny, přítomné ve vzorku v době diagnózy i ve všech následujících odběrech jsou označovány jako primární nebo časné. Aberace získané v průběhu klonálního vývoje jsou nazývány sekundárními nebo pozdními.

Zisk nových chromosomových aberací byl původně spojován s progresí do AML (30-60 %), později se však prokázalo, že tento jev nemusí být nutně spojen s transformací onemocnění (Tricot G *et al.*, 1985; Benítez J *et al.*, 1985; Horiike S *et al.*, 1988; Suciú S *et al.*, 1990; White AD *et al.*, 1994; Tien H-F *et al.*, 1995; de Souza Fernandez T *et al.*, 2000; Bernasconi P *et al.*, 2010; Neukirchen J *et al.*, 2017). Celá řada studií prokázala, že klonální vývoj je negativním prognostickým faktorem a dochází k němu častěji u MDS vysokého rizika než u MDS s nízkým rizikem (Bernasconi P *et al.*, 2010; Haferlach C *et al.*, 2011; Jabbour E *et al.*, 2013; Neukirchen

J *et al.*, 2017; Schanz J *et al.*, 2018b). Podobně u pacientů s normálním karyotypem v době diagnózy je pravděpodobnost klonálního vývoje nižší než u nemocných s chromosomovými změnami přítomnými již na začátku sledování (Neukirchen J *et al.*, 2017). Schanzová a kolegové ve studii se 729 pacienty s MDS potvrdili asociaci klonálního vývoje s horší prognózou (Schanz J *et al.*, 2018b). Celkové přežití pacientů s klonálním vývojem bylo 18 měsíců oproti 54 měsícům u nemocných bez evoluce klonu. Součástí výzkumů byla i snaha najít specifické chromosomové změny, které by nemocného předurčovali k zisku nových genomových aberací (de Souza Fernandez T *et al.*, 2000). V rámci vysoké heterogenity identifikovaných primárních a sekundárních abnormalit, je však těžké určit, která z nich je rozhodující pro evoluci klonu (Bernasconi P *et al.*, 2010; Bochtler T *et al.*, 2013; Jabbour E *et al.*, 2013; Makishima H *et al.*, 2017; Neukirchen J *et al.*, 2017). Obecně je klonální vývoj spojen se vzrůstající genomovou nestabilitou a nárůstem počtu chromosomových abnormalit ovlivňujících délku celkového přežití pacientů (Bernasconi P *et al.*, 2010; Wang H *et al.*, 2010; Neukirchen J *et al.*, 2017; Schanz J *et al.*, 2018b; Feurstein S *et al.*, 2018).

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo s použitím cytogenomických metod identifikovat a detailně charakterizovat genomové změny v buňkách kostní dřeně nemocných s leukémiemi a preleukémiemi a posoudit jejich prognostický význam.

Specifické cíle:

- U nemocných s leukémiemi a preleukémiemi podrobně studovat genomové změny v nádorových buňkách s využitím konvenčních a cytogenomických metod (G-pruhování, FISH, mFISH, mBAND, array CGH).
- Porovnat cytogenomické nálezy v době stanovení diagnózy a při opakovaných vyšetřeních v průběhu onemocnění.
- Určit genomové oblasti a/nebo geny, ve kterých nejčastěji dochází ke vzniku sekundárních změn a posoudit, zda tyto změny vznikají v důsledku terapie nebo přímo souvisí s progresí maligního leukemického klonu.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Materiál

V letech 2007-2017 bylo v Centru nádorové cytogenomiky vyšetřeno celkem 469 nemocných s diagnózou MDS, u kterých byly k dispozici minimálně dva odběry KD nebo PK (v případě, že byl v PK přítomen dostatek blastů). Pokud byly ve druhém, případně některém z následujících kontrolních vzorků, nalezeny chromosomové změny, které nebyly přítomny ve vzorku z doby diagnózy, byla provedena retrospektivní analýza k ověření, zda byly tyto aberace získány v průběhu klonálního vývoje nebo zda byly přítomny již v diagnostickém vzorku, ale byly v té době pod rezolučním limitem použitých vyšetřovacích metod.

Lineární klonální vývoj byl potvrzen u 36 z 469 (8 %) pacientů. Celkem bylo u 36 nemocných vyšetřeno 170 vzorků, z toho 168 KD a 2 PK, v průměru šlo o pět vzorků na jednoho pacienta (medián 4, rozmezí 2-10). Do skupiny bylo zařazeno 17 mužů a 19 žen. Medián věku nemocných v době diagnózy byl 68,5 roku. Primární MDS mělo 32 pacientů a ve čtyřech případech se jednalo o sekundární MDS. Medián přežití do události (EFS; event free survival) a celkového přežití (OS; overall survival) v celé skupině byl 16, respektive 25 měsíců (rozmezí 2-63 měsíců EFS, 7-90 měsíců OS).

Skupina byla rozdělena podle WHO klasifikace (Arber *et al.*, 2016) následovně: MDS s izolovanou del(5q) – šest pacientů, MDS-MLD – 16 nemocných, MDS-EB1 – pět pacientů, MDS-EB2 – tři nemocní, AML s myelodysplastickými rysy (MDS-AML) – dva pacienti, MDS-U – dva nemocní, CMML – dva pacienti.

Základní charakteristika souboru nemocných s MDS a lineárním klonálním vývojem je uvedena v tabulce č. 6 a základní charakteristiky jednotlivých pacientů jsou zobrazeny v tabulce č. 7. Podrobné výsledky klasické cytogenetiky a molekulárně-genetických metod u jednotlivých pacientů jsou uvedeny v příloze č. 1.

**Tabulka 6:** Základní charakteristika souboru pacientů s MDS a lineárním klonálním vývojem

	<b>Celkem (%)</b>
<b>Počet pacientů</b>	36/469 (8 %)
<b>Pohlaví</b>	
Muži	17 (47 %)
Ženy	19 (53 %)
<b>Věk v době diagnózy (roky)</b>	
Medián (rozmezí)	68.5 (29–83)
≤ 60	9 (25 %)
> 60	27 (75 %)
<b>Přežití do klonálního vývoje (měsíce)</b>	
Medián (rozmezí)	16 (2–63)
≤ 12 měsíců	12 (33 %)
> 12 měsíců	24 (67 %)
<b>Celkové přežití (měsíce)</b>	
Medián (rozmezí)	25 (7–90)
≤ 24 měsíců	15 (45 %)
> 24 měsíců	18 (55 %)
<b>WHO klasifikace 2016</b>	
MDS s izolovanou del(5q)	6 (17 %)
MDS-MLD	16 (44 %)
MDS-EB1	5 (14 %)
MDS-EB2	3 (8 %)
MDS-AML	2 (6 %)
MDS-U	2 (6 %)
CMML	2 (6 %)
Primární MDS	31 (86 %)
Sekundární MDS	5 (14 %)

**Tabulka 7:** Základní charakteristiky nemocných s MDS a lineárním klonálním vývojem

ID	Pohlaví	Věk v době diagnózy	Diagnóza	Primární (P)/Sekundární (S) MDS	EFS (měsíc)	OS (měsíc)
1	Ž	73	MDS-EB1	P	11	23+
2	M	61	MDS-MLD	P	13	22+
3	M	83	MDS-AML	P	12	15+
4	M	59	MDS-MLD	P	37	38+
5	Ž	52	MDS-U	P	62	75
6	Ž	79	MDS-EB2	P	3	7+
7	Ž	73	MDS-MLD	P	30	ND
8	Ž	70	MDS-MLD	P	11	15+
9	M	70	MDS-MLD	P	49	69+
10	M	59	MDS-EB2	S	4	26
11	Ž	68	MDS-AML	P	16	ND
12	M	74	MDS-MLD	P	16	31+
13	Ž	58	MDS-MLD	P	22	31+
14	Ž	70	MDS-MLD	P	2	25+
15	M	70	MDS-EB1	P	19	24+
16	Ž	29	MDS-MLD	P	42	85+
17	M	68	MDS-MLD	P	33	38+
18	Ž	61	MDS s izolovanou del(5q)	P	23	24+
19	Ž	65	CMML	P	9	10+
20	M	67	MDS-EB1	P	37	50+
21	M	71	MDS-MLD	P	44	49+
22	M	40	MDS s izolovanou del(5q)	P	6	40+
23	Ž	72	MDS-EB1	P	16	42+
24	Ž	71	MDS s izolovanou del(5q)	P	14	62+
25	M	69	MDS-MLD	P	12	24+
26	Ž	80	MDS s izolovanou del(5q)	P	20	90
27	Ž	65	MDS-AML	S	15	15+
28	Ž	78	MDS-EB2	S	20	36+
29	Ž	56	MDS s izolovanou del(5q)	P	63	71+
30	M	72	MDS-MLD	P	15	23+
31	M	73	MDS-EB1	P	10	15+
32	M	60	CMML	P	18	ND
33	Ž	64	MDS-U	S	17	23+
34	M	62	MDS-MLD	S	7	22+
35	M	50	MDS-MLD	P	7	11+
36	Ž	82	MDS-MLD	P	15	25+

ID = identifikační číslo pacienta; EFS = přežití do události; OS = celkové přežití;  
 ND = klinická data nejsou k dispozici; † = pacient zemřel

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Klasická cytogenetická analýza

Vzorky KD všech nemocných v souboru byly zpracovány standardním cytogenetickým postupem. Po 24hodinové kultivaci v MarrowGrow (buňky KD) nebo LymphoGrow (buňky PK) médiu, byl přidán kolcemid, hypotonický a fixační roztok (metanol/kyselina octová 3:1). Fixovaná buněčná suspenze byla po nakapání na podložní skla barvena Wrightovým barvivem (G-pruhy). Hodnocení karyotypů bylo provedeno pomocí IKAROS zobrazovacího systému (MetaSystems<sup>TM</sup>) a v případě dostatečného množství dělících se buněk bylo analyzováno alespoň 20 mitos. Výsledný zápis nálezu byl popsán podle mezinárodní cytogenomické nomenklatury (ISCN; An International System for Human Cytogenomic Nomenclature) (ISCN, 2016).

### 3.2.2 Molekulárně-genetická analýza

K ověření chromosomových aberací nalezených pomocí klasické cytogenetické analýzy byly použity metody interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH), mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH) a mnohobarevného pruhování (mBAND). K průkazu nebalancovaných změn karyotypu, upřesnění zlomových míst a identifikaci aUPD byly použity mikročipové metody.

#### 3.2.2.1 I-FISH analýza

Pro I-FISH analýzu byly využity komerčně dodávané lokus-specifické, centromerické a subtelomerické DNA sondy (Abbott Vysis<sup>TM</sup>, Kreatech<sup>TM</sup>, MetaSystems<sup>TM</sup>). Pro potvrzení specifických nálezů z mikročipových analýz byly použity BAC (bacterial artificial chromosome) sondy od firmy BlueGnome.

Preparáty pro I-FISH analýzy byly připravovány konvenčním způsobem a zpracovány dle protokolů doporučených výrobcí. Následná analýza probíhala za pomoci fluorescenčního mikroskopu AXIOPLAN 2 Imaging (Zeiss), který je vybaven specifickými optickými filtry pro detekci použitých fluorochromů. U každého preparátu byly hodnoceny počty a charakter fluorescenčních signálů ve 20 mitosách (pokud byly přítomny) a 200 interfázních jádrech dvěma nezávislými hodnotiteli. Hranice cut-off level byla stanovena na základě vyšetření kontrolního souboru 10 zdravých osob na 5 %



u delecí a 2,5 % u translokací a/nebo zisků chromosomového materiálu (Šindelářová L *et al.*, 2005). Patologické nálezy byly zdokumentovány CCD kamerou, zpracovány v softwaru ISIS (MetaSystems<sup>TM</sup>) a popsány dle ISCN nomenklatury (ISCN, 2016).

### 3.2.2.2 *mFISH/mBAND analýza*

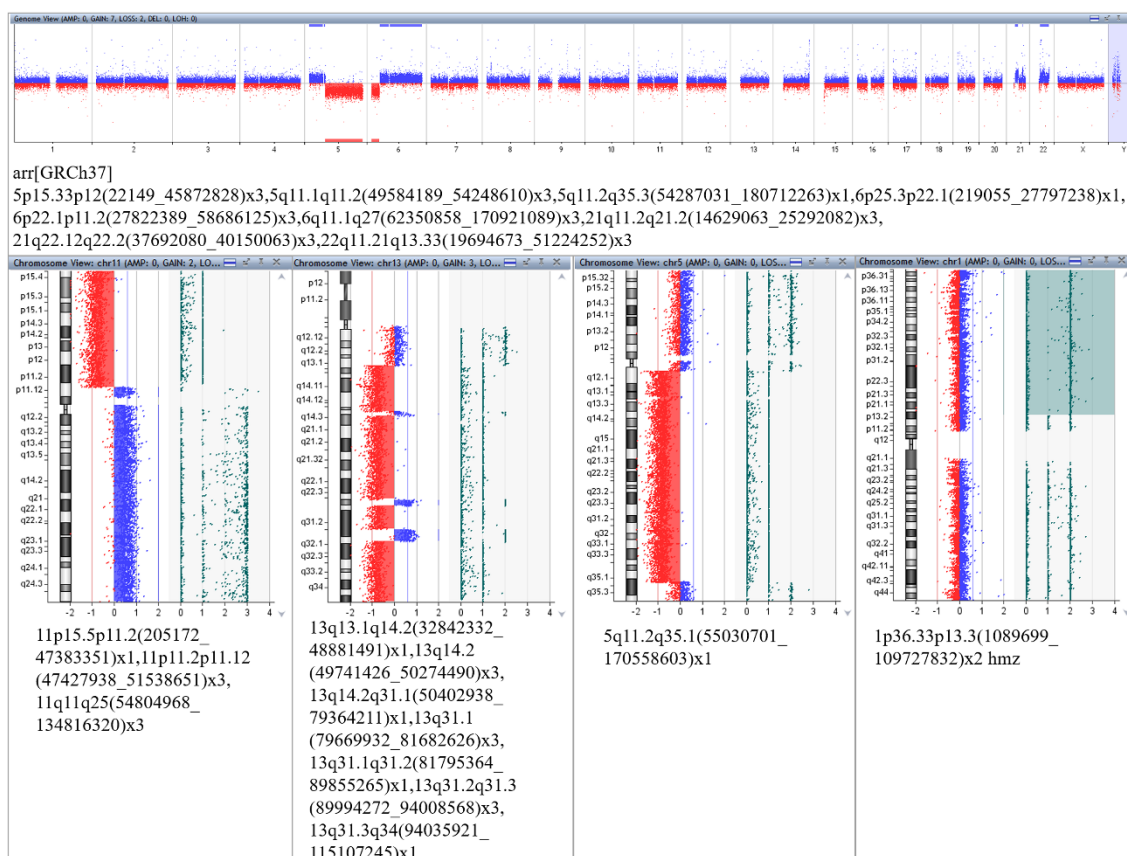
K upřesnění komplexních chromosomových změn a případných zlomových míst byly využity metody mFISH a/nebo mBAND. Preparáty byly připravovány stejným způsobem jako pro konvenční analýzu a hybridizace sond probíhala dle postupů doporučených výrobcem. Metoda mFISH využívá kombinatoriální značení směsí celochromosomových malovacích sond značených pěti různými fluorochromy v jedné reakci: FITC, Spectrum Orange<sup>TM</sup>, TexasRed®, DEAC a Cy<sup>TM</sup>5. Podobně metoda mBAND používá parciální malovací sondy se stejnou směsí fluorochromů, které hybridizují k jednotlivým úsekům vybraného chromosomu. Po nasnímání mitos fluorescenčním mikroskopem AXIOPLAN 2 Imaging (Zeiss) byly v softwaru ISIS (MetaSystems<sup>TM</sup>) kombinacím jednotlivých fluorochromů přiřazeny falešné barvy (tzv. pseudobarvy) umožňující zhodnocení chromosomových abnormalit. Bylo hodnoceno alespoň 20 mitos a nálezy byly zapsány podle ISCN nomenklatury (ISCN, 2016).

### 3.2.2.3 *Mikročipové metody*

DNA pro mikročipovou analýzu (aCGH/SNP; komparativní genomová hybridizace/jednonukleotidové polymorfismy na mikročipu) byla izolována za pomoci QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen Inc.). Koncentrace a kvalita DNA byla měřena spektrofotometrem NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Na čip bylo hybridizováno 1000 ng izolované DNA v souladu s protokolem výrobce. Byly použity čipy CytoChip Cancer SNP 4x180K v2.0, CytoChip Cancer 4x180K v2.0 (Illumina Inc.) a/nebo SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray, 4x180K (Agilent technologies). Čipy byly skenovány pomocí systému Agilent G2565CA Microarray Scanner (Agilent technologies) a hodnoceny v softwaru BlueFuse Multi v3.1-4.2 (Illumina Inc.) nebo Agilent Cytogenomics v4.0.3.12-5.0.1 (Agilent technologies) (Obr. 11). Vyhodnocení oligonukleotidových sond je založeno na porovnání intenzit fluorescenčního signálu značeného vzorku (Cyanine 3-dUTP) a referenční DNA

(Cyanine 5-dUTP). Analýza SNP sond byla provedena na základě intenzity fluorescenčního signálu hybridizované DNA, která závisí na záměně nukleotidu v místě štěpení DNA restriktázami *AluI* a *RsaI*. Nálezy byly popsány v souladu s ISCN nomenklaturou (ISCN, 2016).

**Obrázek 11:** Schématické znázornění karyotypu v programu Agilent Cytogenomics



Červeně jsou označeny ztráty a modře zisky genetického materiálu. aUPD je znázorněna na obrázku zcela vpravo, kdy nedochází ke změně počtu kopií DNA, ale v modrém obdélníku je zobrazena oblast se ztrátou heterozygosity. Pod jednotlivými obrázky jsou uvedeny příklady zápisu nálezu z mikročipu podle ISCN nomenklatury (ISCN, 2016).

### 3.2.2.4 Sekvenační metody

Pro NGS byla použita DNA izolovaná pro aCGH/SNP. Koncentrace a kvalita DNA byla kontrolována za pomoci Qubit 4 fluorometru (ThermoFisher Scientific). K přípravě knihovny bylo u každého vzorku použito 100 ng DNA a kvantifikace proběhla za pomoci kitu KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems). U většiny vzorků proběhla sekvenace na platformě NextSeq (Illumina Inc.) s použitím

VariantPlex Myeloid panelu (ArcherDX) určeného k detekci mutací 75 genů se zaměřením na diagnózy AML, myeloproliferativní onemocnění, MDS a některé lymfoidní malignity. U části nemocných s aUPD 17p byla pro ověření mutace genu *TP53* použita platforma 454 GS Junior (Roche) specificky zaměřená na mutace tohoto genu. Sekvenační postupy probíhaly dle doporučení výrobce. Nalezené mutace byly hodnoceny a klasifikovány s pomocí databází ClinVar at the National Center of Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) a International Agency for Research on Cancer *TP53* Database (IARC *TP53* Database; <http://p53.iarc.fr>) (Bouaoun L *et al.*, 2016; Forbes SA *et al.*, 2017; Landrum M *et al.*, 2018).

### 3.2.3 Statistická analýza

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno Kaplan-Meierovou analýzou přežití s Mantel-Coxovým testem přežití. EFS je definováno jako doba od stanovení diagnózy po nalezení nově získaných chromosomových změn (tj. vzniku klonálního vývoje). OS bylo počítáno jako doba od diagnózy do smrti či do posledního známého kontrolního odběru pacienta. Data přežití do EFS a OS byla podrobena Coxově vícerozměrné regresní analýze, která krokovým způsobem ze zadaných parametrů vybírá ten, který přežití nejvíce ovlivňuje (nezávislý parametr).

## **4 VÝSLEDKY**

### **4.1 Lineární klonální vývoj**

Mezi lety 2007 a 2017 bylo na našem pracovišti vyšetřeno celkem 469 pacientů s diagnózou MDS, u kterých byly dostupné minimálně dva odběry KD nebo PK s časovým odstupem. U 36 z 469 (8 %) nemocných byl potvrzen lineární klonální vývoj (dále jen klonální vývoj), tedy získ nových chromosomových aberací v čase mezi diagnostickým a kontrolním vzorkem.

U nemocných, u nichž byly pomocí klasické cytogenetické analýzy zaznamenány ve druhém nebo následujícím odběru KD nebo PK nové chromosomové změny, byly provedeny detailní molekulárně-genetické analýzy těchto aberací.

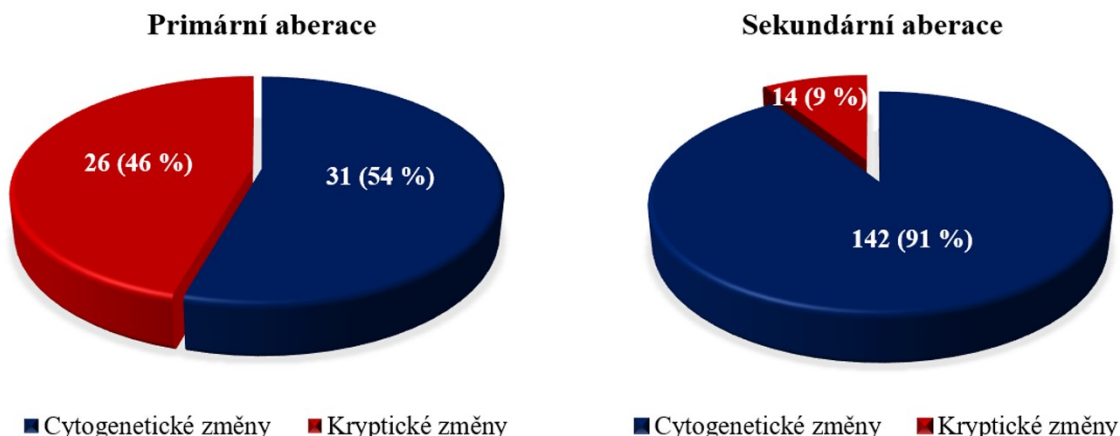
Počty změn v karyotypu byly určovány podle dříve publikovaných pravidel (Zemanova *Z et al.*, 2014). Balancované reciproké translokace, balancované inzerce a inverze, aneuploidie celých chromosomů, prosté delece, duplikace/amplifikace a ring chromosomy tvořené materiálem z jednoho chromosomu byly počítány jako jedna abnormalita. Nebalancované přestavby zahrnující dva a více chromosomů byly zaznamenávány jako dvě a více aberací v závislosti na počtu zahrnutých chromosomů.

Mezi MDS specifické byly řazeny změny, které jsou v současné době zahrnuty v systému IPSS-R. Zároveň zde byly zařazeny změny typické pro transformaci MDS do AML a oblasti aUPD, které jsou v současné literatuře spojovány s homozygotními mutacemi genů asociovaných s diagnózou MDS (Obr. 1, tab. 5). Ostatní nalezené aberace byly označeny jako MDS nespecifické.

### **4.2 Chromosomové změny**

Celkově bylo ve studovaném souboru identifikováno 213 chromosomových změn (Obr. 12). Konvenční cytogenetickou analýzou bylo nalezeno 31 primárních aberací v době diagnózy a 142 sekundárních abnormalit získaných v průběhu onemocnění.

**Obrázek 12:** Přehled nalezených chromosomových změn u 36 nemocných s klonálním vývojem



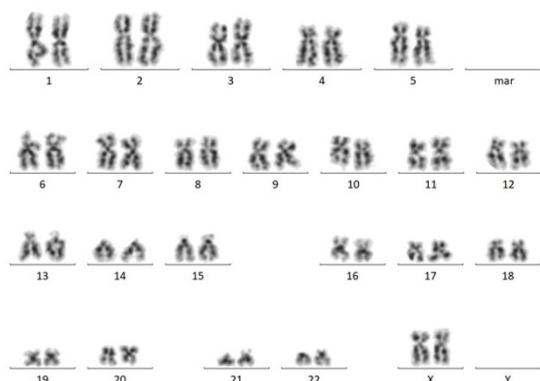
Za pomoci molekulárně-genetických metod bylo v době klonálního vývoje popsáno dalších 42 změn, které byly označeny jako kryptické (pod detekčním limitem klasické cytogenetické analýzy). Na základě retrospektivních analýz byla přítomnost 26 kryptických změn potvrzena již v době diagnózy. U těchto aberací došlo v průběhu onemocnění ke klonální expanzi již existujícího klonu. Jako sekundární bylo označeno 14 kryptických abnormalit získaných během klonálního vývoje. Prostřednictvím mikročipových metod byly nalezeny dvě změny, u kterých nebylo možné specifikovat dobu jejich vzniku. Šlo o oblasti aUPD(5)(p15.1p14.3) a aUPD(7)(q11.22qter) u nemocného č. 4 (Příloha č. 1). V tomto případě nebyl k dispozici archivovaný materiál z doby diagnózy pro další analýzy. Nebylo tedy možné ověřit, zda ke vzniku aUPD došlo v době diagnózy či až v průběhu onemocnění.

Příklad pacientky s retrospektivně prokázaným aUPD 4q v diagnostickém vzorku je uveden na obrázku č. 13. Detailní popis nalezených aberací u 36 pacientů s MDS a klonálním vývojem je uveden v příloze č. 1.

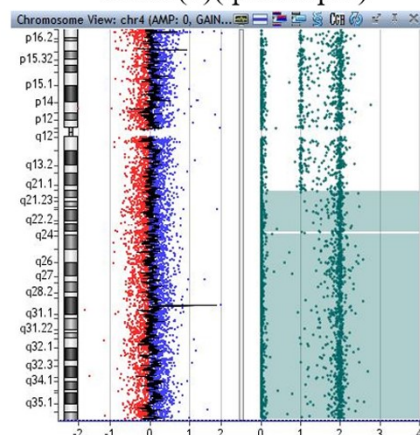
**Obrázek 13:** Příklad pacientky č. 19 s aUPD 4q

**4/2010 diagnóza MDS**

Nález: 46,XX

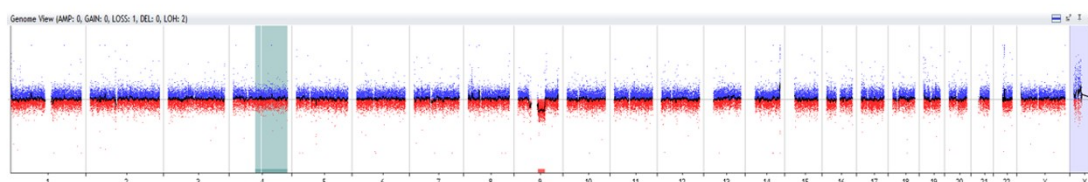


Retrospektivně potvrzený nález aCGH/SNP:  
aUPD(4)(q21.21qter)



**1/2011 klonální vývoj a progres onemocnění do AML**

Nález aCGH/SNP: aUPD(4)(q21.21qter),del(9)(q21.11q22.2)



## 4.2.1 Primární aberace

### 4.2.1.1 Přehled primárních chromosomových aberací

V době diagnózy bylo u 36 nemocných s MDS a klonálním vývojem klasickou cytogenetickou analýzou prokázáno 31 primárních chromosomových aberací a molekulárně-genetickými metodami dalších 26 primárních kryptických změn. Celkem bylo jako primární označeno 57 chromosomových aberací (Obr. 14). Dvanáct nemocných mělo v době diagnózy normální karyotyp.

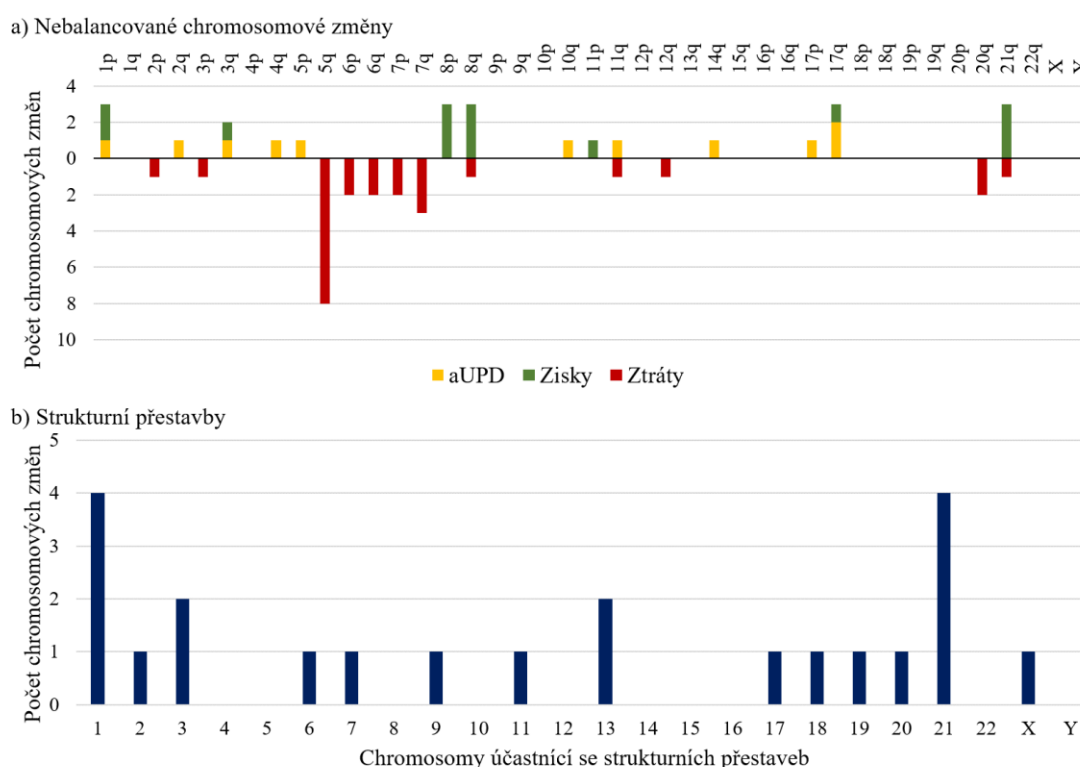
V devíti případech byly detekovány zisky chromosomového materiálu, nejčastěji trisomie 8 (n=3) a parciální trisomie chromosomu 21 (n=3). Po jednom výskytu pak byly zaznamenány nadpočetné kopie 1p, 11q a 17q.

Z 19 ztrát genetického materiálu v době diagnózy byla nejčastější del(5q) (n=8). Del(7q) nebo monosomie 7 byly zaznamenány u tří vzorků. Dvakrát byly identifikovány del(6q) a del(20q). Jednou byla detekována ztráta celého chromosomu 21 a delece v oblastech 2p, 8q a 12q.

Z 26 kryptických změn prokázaných v době diagnózy bylo 11 charakteru aUPD. Oblasti aUPD byly prokázány na chromosomech 1 (n=1), 2 (n=1), 3 (n=1), 4 (n=1), 5 (n=1), 10 (n=1), 11 (n=1), 14 (n=1), a 17 (n=3). Na chromosomu 17 byla dvakrát prokázána aUPD na dlouhých ramenech a jednou na krátkých. Podrobněji o aUPD pojednává kapitola 4.3.

V době diagnózy byly identifikovány čtyři balancované a sedm nebalancovaných strukturních přestaveb chromosomů. Nejčastěji se strukturních změn účastnily chromosomy 1 (n=4) a 21 (n=4).

**Obrázek 14:** Přehled primárních chromosomových změn u 36 pacientů s klonálním vývojem

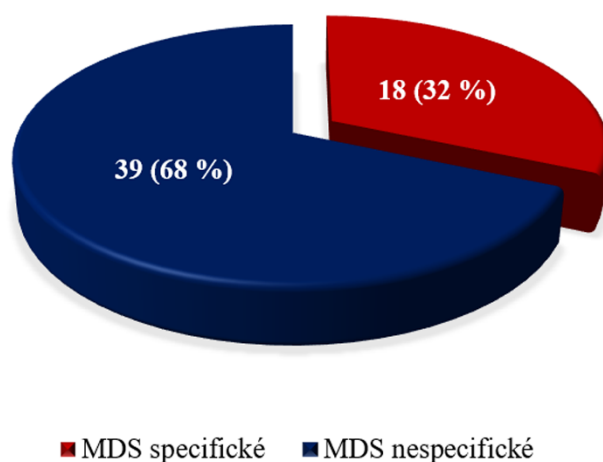


#### 4.2.1.2 MDS specifické primární změny

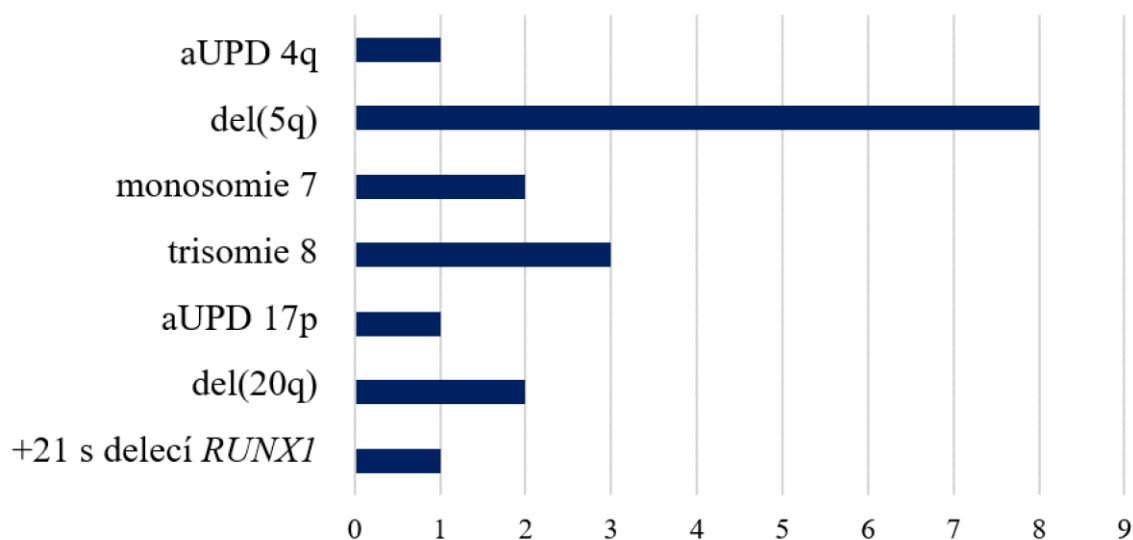
Z 57 primárních změn bylo 18 MDS specifických a 39 nespecifických (Obr. 15).

Nejčastěji byla prokázána del(5q) (n=8) (Obr. 16). Ostatní detekované MDS specifické změny byly trisomie 8 (n=3), monosomie 7 (n=2), del(20q) (n=2), aUPD 4q (n=1), aUPD 17p (n=1) a nadpočetný derivovaný chromosom 21 s delecí *RUNX1* genu (n=1).

**Obrázek 15:** Zastoupení změn specifických a nespecifických pro diagnózu MDS u nalezených primárních aberací



**Obrázek 16:** Přehled MDS specifických primárních změn



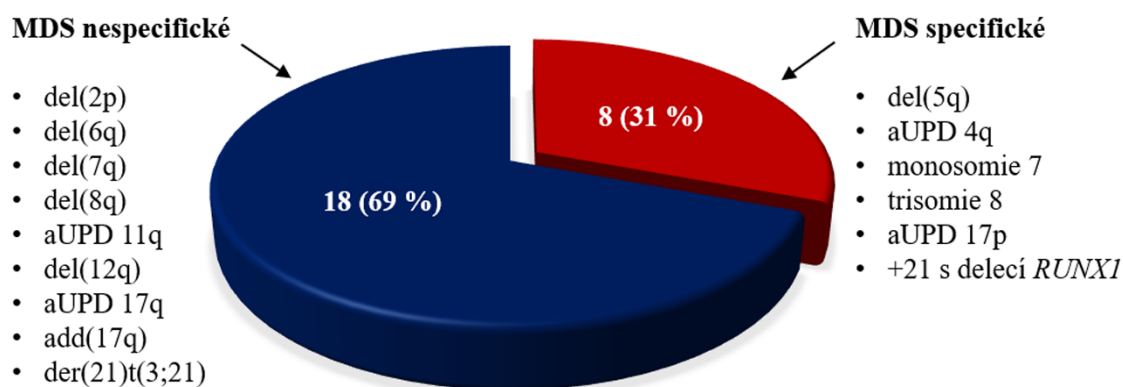
#### 4.2.1.3 Kryptické primární změny

Mezi kryptické primární změny bylo zařazeno 26 chromosomových změn, z toho osm bylo MDS specifických a 18 nespecifických (Obr. 17).

Mezi MDS specifické změny patřily del(5q) (n=2), aUPD 4q (n=1), monosomie 7 (n=2), trisomie 8 (n=1), aUPD 17p (n=1) a trisomie 21 se současnou delecí *RUNX1* genu (n=1).



**Obrázek 17:** Přehled kryptických primárních změn nalezených cytogenomickými metodami



## 4.2.2 Sekundární aberace

### 4.2.2.1 Přehled sekundárních chromosomových aberací

U 36 pacientů bylo konvenční cytogenetickou analýzou prokázáno 142 sekundárních aberací. Molekulárně-genetickými metodami bylo identifikováno dalších 14 sekundárních kryptických změn. Celkem bylo v souboru v době klonálního vývoje popsáno 156 sekundárních chromosomových aberací (Obr. 18).

Zisk genetického materiálu byl nalezen v 63 případech, v průměru dvě změny na jednoho nemocného (medián 1, rozmezí 0-10). Ve většině případů se jednalo o trisomie/tetrasomie celých chromosomů (52/63). Nejčastěji byly prokázány trisomie/tetrasomie chromosomu 8 (n=12) a trisomie/tetrasomie chromosomu 21 (n=6). Kromě toho u tří pacientů byly prokázány tri-/tetraploidní počty chromosomů.

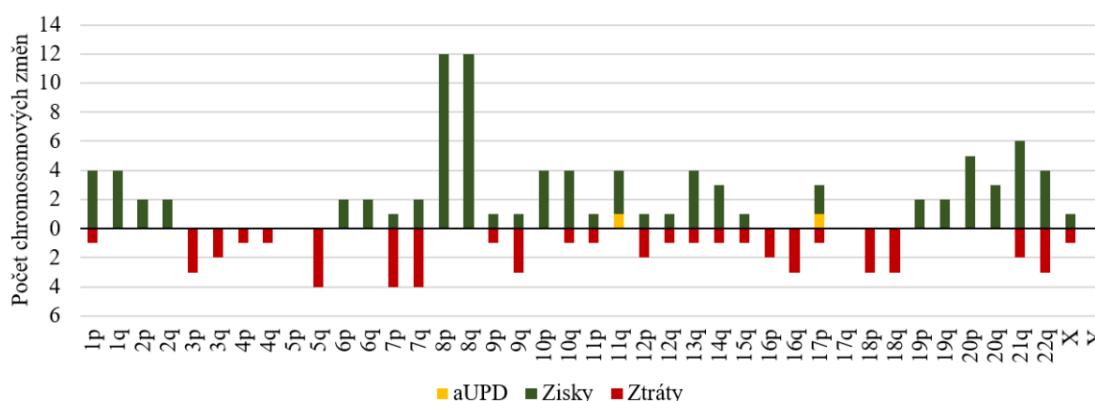
Ke ztrátě chromosomového materiálu došlo ve 33 případech, s průměrem jedné aberace na pacienta (medián 0, rozmezí 0-8). Nad ztrátami celých chromosomů převládaly delece částí dlouhých nebo krátkých ramen. Nejčastějšími změnami byly del(5q) (n=4) a monosomie chromosomu 7 (n=4).

V průběhu onemocnění byly identifikovány dvě nově získané sekundární aUPD. U pacienta č. 22 byla prokázána aUPD(17)(p13.1p13.3), která nebyla zpětně prokázána v diagnostickém odběru. U pacientky č. 27 byla již při diagnóze nalezena aUPD 11q, v průběhu klonálního vývoje však došlo ke změně její velikosti. Podrobněji o aUPD pojednává kapitola 4.3.

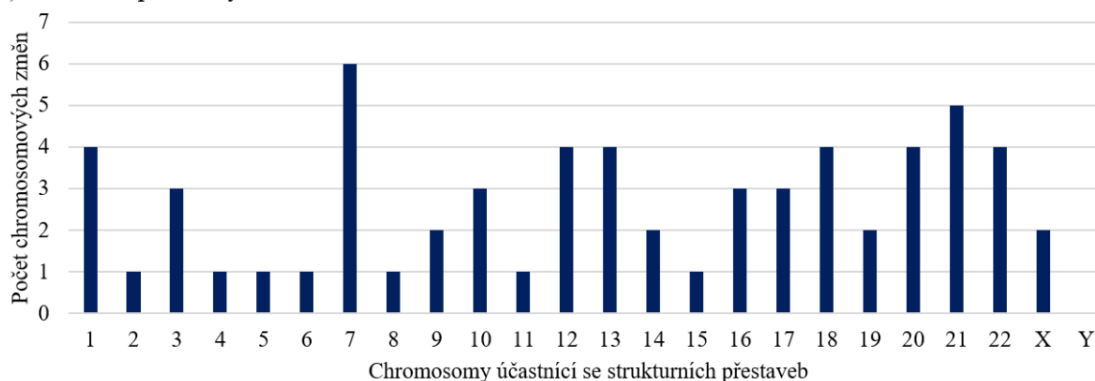
Mezi aberacemi získanými v průběhu onemocnění byly prokázány dvě balancované a 26 nebalancovaných strukturních změn karyotypu, do kterých vstupovaly téměř všechny chromosomy s výjimkou chromosomu Y. Nejčastěji do přestaveb vstupoval chromosom 7 (n=6), konkrétně jeho dlouhá ramena (n=5).

**Obrázek 18:** Přehled sekundárních chromosomových změn u 36 pacientů s klonálním vývojem

a) Nebalancované chromosomové změny



b) Strukturní přestavby

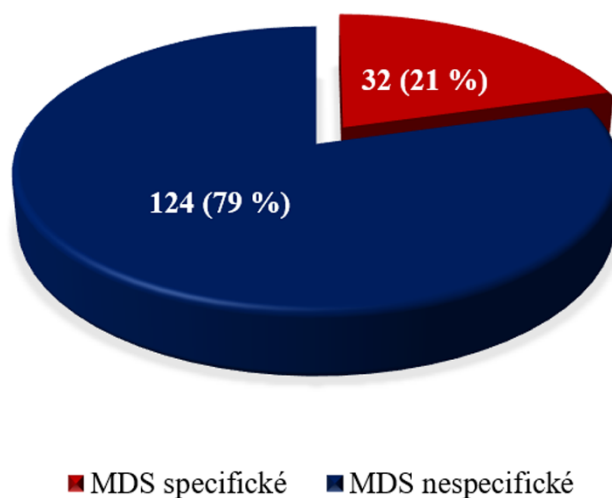


#### 4.2.2.2 MDS specifické sekundární změny

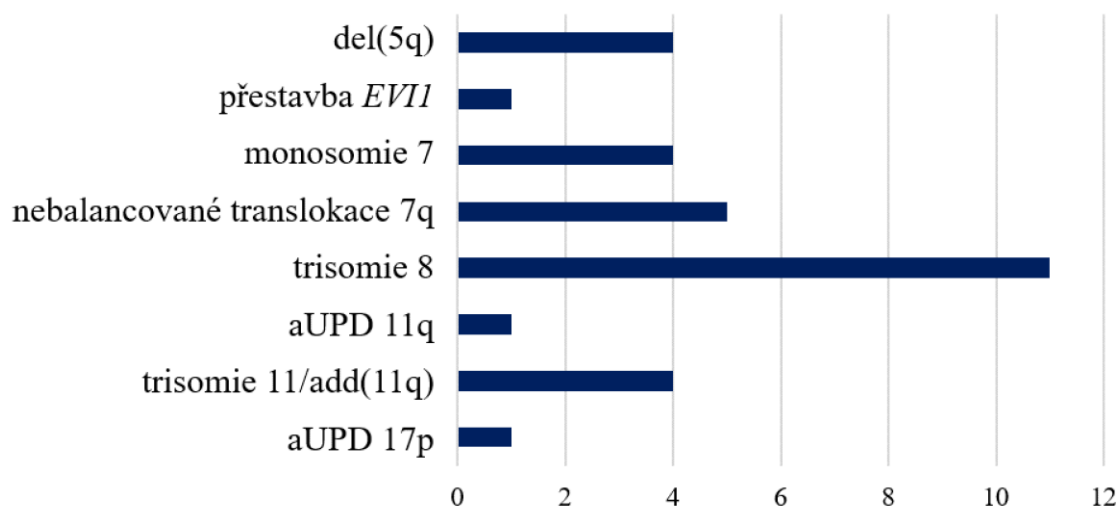
Z identifikovaných 156 sekundárních změn bylo 32 MDS specifických a 124 nespecifických (Obr. 19).

Nejčastější MDS specifickou sekundární změnou byla trisomie chromosomu 8 (n=11) (Obr. 20). Další nalezené MDS specifické sekundární změny byly del(5q) (n=4), monosomie chromosomu 7 (n=4), trisomie 11/amplifikace 11q (n=4), přestavba *EVII* genu (n=1), aUPD 11q (n=1) a aUPD 17p (n=1).

**Obrázek 19:** Zastoupení změn specifických a nespecifických pro diagnózu MDS u nalezených sekundárních aberací



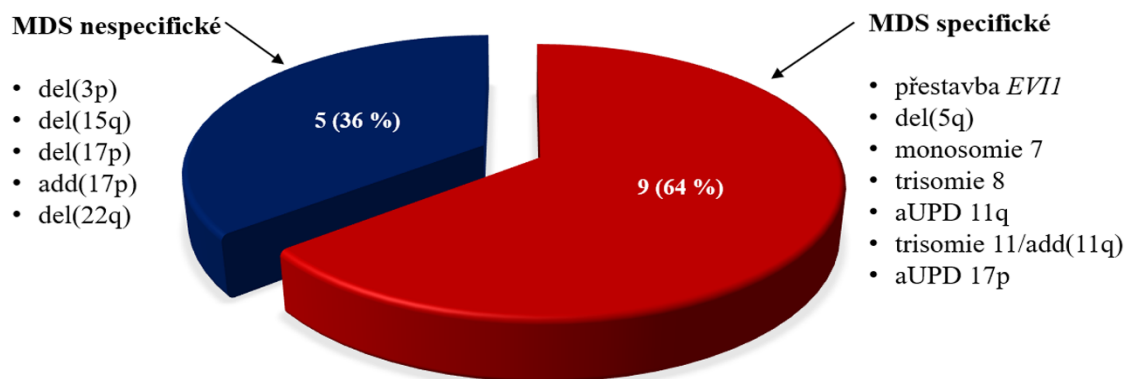
**Obrázek 20:** Přehled MDS specifických sekundárních změn



#### 4.2.2.3 Kryptické sekundární změny

Ze 14 kryptických sekundárních změn bylo devět aberací MDS specifických: del(5q) (n=1), přestavba *EVII* genu (n=1), monosomie 7 (n=1), trisomie 8 (n=1), trisomie 11/zisk 11q/aUPD 11q (n=4) a aUPD 17p (n=1) (Obr. 21). Zbývajících šest abnormalit bylo nespecifických a zahrnovaly chromosomy 3, 15, 17 a 22.

**Obrázek 21:** Přehled kryptických sekundárních změn nalezených cytogenomickými metodami



### 4.3 Získaná uniparentální disomie

Ve skupině 36 nemocných s diagnózou MDS a klonálním vývojem bylo identifikováno 14 oblastí aUPD celkem u sedmi pacientů (19 %). V době diagnózy bylo potvrzeno 11 oblastí, jedna byla identifikována až v průběhu progresu onemocnění a u dvou nebylo možné specifikovat původ z důvodu nedostatku materiálu z doby prvního odběru vzorku (Tab. 8).

U pěti nemocných byly identifikovány oblasti spojené s diagnózou MDS asociované s homozygotními mutacemi rekurentních genů: aUPD 4q (*TET2*) (n=1), aUPD 7q (*EZH2*) (n=1), aUPD 11q (*c-CBL*) (n=1) a aUPD 17p (*TP53*) (n=2) (Tab. 9).

U pacienta č. 4 s aUPD(7)(q11.22qter) byla identifikována homozygotní mutace genu *EZH2* (c.118-4delT) s velikostí patologického klonu 76 %. Jde o mutaci v intronu, která nezasahuje do sestřihových míst genu a je považována za benigní variantu, která neovlivňuje vznik a vývoj MDS.

Nemocná č. 19 s aUPD(4)(q21.21qter) měla homozygotní pravděpodobně patogenní posunovou mutaci (c.5692delT) genu *TET2* v 96 % buněk.

U pacientky č. 27 došlo během klonálního vývoje kromě zisku nových chromosomových aberací i ke změně velikosti aUPD 11q (Obr. 22). Původně šlo o změnu s rozsahem 11q14.2q21 o velikosti 5,6 Mb. V pátém odběru byl u nemocné prokázán klonální vývoj, jehož důsledkem mimo jiné bylo i zvětšení zasažené oblasti aUPD zahrnující i gen *c-CBL*, a to v rozsahu 11q13.2qter o velikosti 67,7 Mb. V obou vzorcích byla zároveň prokázána patogenní bodová mutace genu *c-CBL* (11q23.3).

**Tabulka 8:** Přehled aUPD nalezených v souboru pacientů s MDS a klonálním vývojem

ID	aUPD	Velikost aUPD (Mb)	Typ změny	Geny asociované s MDS
4	5p15.1p14.3	7	nespecifikováno	-
	7q11.22qter	91,1	nespecifikováno	<i>EZH2</i>
19	4q21.21qter	111,5	primární	<i>TET2</i>
22	17p13.3p13.1	5	sekundární	<i>TP53</i>
25	17q23,1q24.1	5,2	primární	-
27	11q14.2q21	5,6	primární	-
	11q13.2qter	67,7	sekundární	<i>c-CBL</i>
33	1p31.3p21.2	37,5	primární	-
	2q34q36.1	12,6	primární	-
	3q21.2q22.1	5,8	primární	-
	5p14.3p13.2	12,2	primární	-
	10q22.2q23.1	5,8	primární	-
	14q22.3q24.2	16,6	primární	-
	17q24.3q25.3	6,1	primární	-
35	17pterp13.1	10,3	primární	<i>TP53</i>

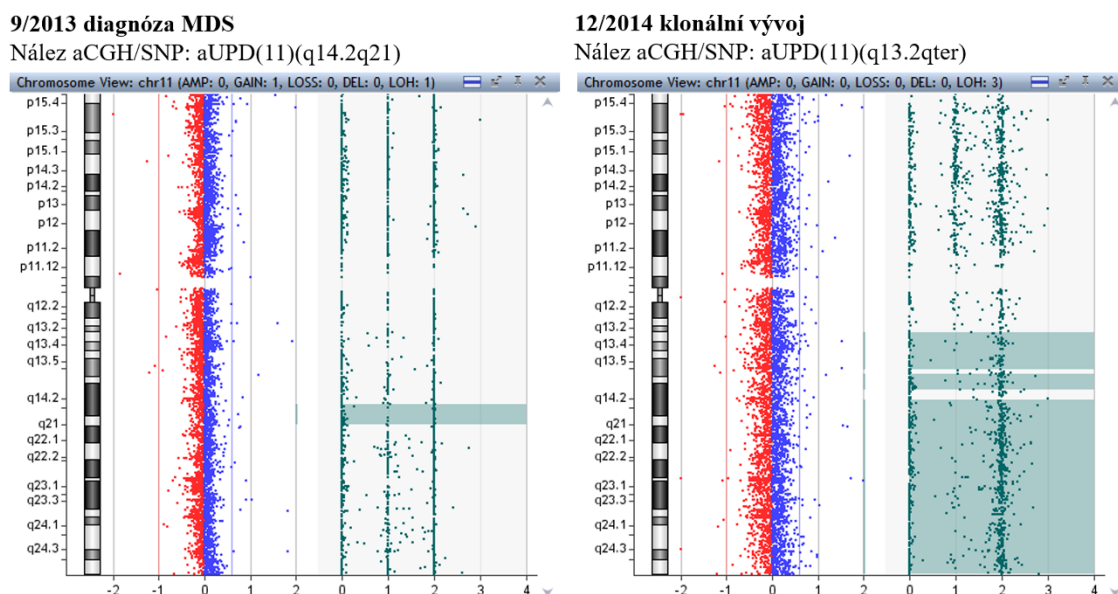
ID = identifikační číslo pacienta

**Tabulka 9:** Přehled mutací rekurentních genů nalezených u pacientů s aUPD asociovanými s diagnózou MDS

ID	Datum odběru	Gen	Patologický klon (%)	Mutace			
				cDNA	Popis proteinu	Typ mutace	Klasifikace
4	9/11	<i>EZH2</i>	76	c.118-4delT	-	Intronová	Benigní
19	4/10	<i>TET2</i>	93	c.5692delT	p.Ser1898 ProfsTer10	Posunová	Pravděpodobně patogenní
22	1/13	<i>TP53</i>	45,5/11	c.524G>A/ c.438G>A	p.Arg175 His/p.Trp146Ter	Bodová/ Nesmyslná	Pravděpodobně patogenní/ patogenní
	7/13		60,6/13,4				
27	9/13	<i>c-CBL</i>	51,7	c.1254C>A	p.Phe418Leu	Bodová	Patogenní
	12/14		98,5				
35	2/13	<i>TP53</i>	78	c.824G>A	p.Cys275 Tyr	Bodová	Patogenní

ID = identifikační číslo pacienta

**Obrázek 22:** Příklad klonálního vývoje aUPD u pacientky č. 27 – rozdílný rozsah aUPD 11q při diagnóze a během klonálního vývoje



U pacienta č. 22 s nově získanou aUPD(17)(p13.3p13.1) byly prokázány dvě mutace genu *TP53* v 60,6 % (c.524G>A) a 13,4 % (c.438G>A) buněk. Obě mutace byly nalezeny i v diagnostickém vzorku v nižším procentuálním zastoupení (45,5/11 %). Mutace c.524G>A je klasifikována jako pravděpodobně patogenní a c.438G>A je řazena mezi patogenní.

Homozygotní mutace genu *TP53* s patogenním potenciálem byla prokázána také u nemocného č. 35 s aUPD(17)(pterp13q1) v 78 % buněk.

#### 4.4 Rozdělení nemocných podle nálezu v době diagnózy

Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin v závislosti na počtu chromosomových aberací potvrzených cytogenomickými metodami v době diagnózy: (1) - normální karyotyp (12/36 nemocných), (2) - jedna změna (14/36 pacientů), (3) – dvě aberace (3/36 nemocných), (4) – tři a více změn (7/36 pacientů). Detailní charakteristika skupin 1-4 je uvedena v tabulce č. 10.

**Tabulka 10:** Základní charakteristika souboru pacientů s MDS a lineárním klonálním vývojem rozděleného do skupin 1–4 podle cytogenomických nálezů v době diagnózy

	1	2	3	4
<b>Počet pacientů</b>	12	14	3	7
<b>Pohlaví</b>				
Muži	6	6	0	5
Ženy	6	8	3	2
<b>Věk v době diagnózy (roky)</b>				
Medián (rozmezí)	70 (52-83)	68,5 (29-80)	65 (56-78)	64 (50-82)
≤ 60	3	3	1	2
> 60	9	11	2	5
<b>Přežití do klonálního vývoje (měsíce)</b>				
Medián (rozmezí)	14,5 (3-62)	19,5 (2-44)	20 (15-63)	15 (7-18)
≤ 12 měsíců	5	4	0	3
> 12 měsíců	7	10	3	4
<b>Celkové přežití (měsíce)</b>				
Medián (rozmezí)	24,5 (7-75)	39 (10-90)	36 (15-71)	22,5 (11-25)
≤ 24 měsíců	5	4	1	5
> 24 měsíců	5	10	2	1
<b>WHO klasifikace 2016</b>				
MDS s izolovanou del(5q)	0	4	2	0
MDS-MLD	6	6	0	4
MDS-EB1	1	3	0	1
MDS-EB2	2	0	1	0
MDS-AML	2	0	0	0
MDS-U	1	0	0	1
CMML	0	1	0	1
Primární MDS	11	14	1	6
Sekundární MDS	1	0	2	2

#### 4.4.1 Skupina 1 – normální karyotyp

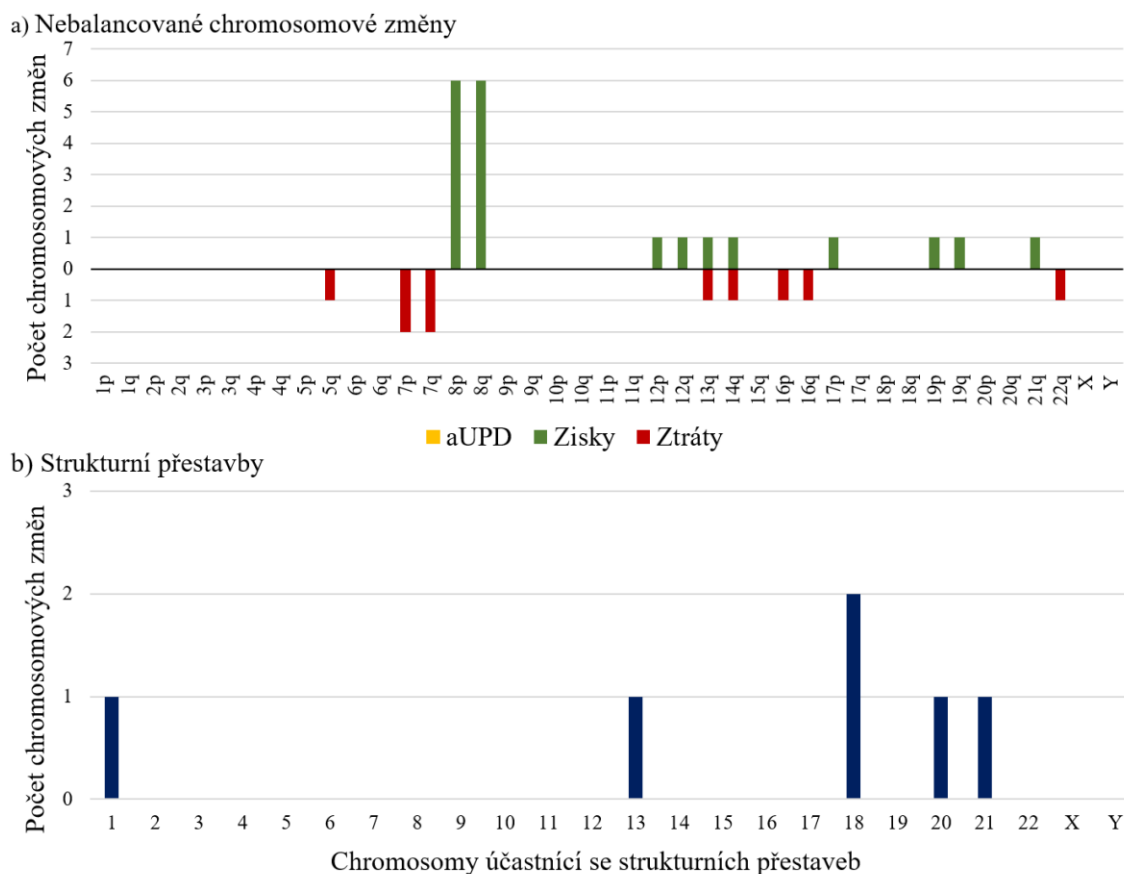
Do skupiny 1 bylo zařazeno 12 nemocných s primárně normálním karyotypem bez chromosomových aberací (Obr. 23).

Celkem bylo ve skupině 1 prokázáno 27 získaných chromosomových aberací v průběhu klonálního vývoje, v průměru dvě abnormality na jednoho pacienta (medián 1, rozmezí 1-9). Ve dvou případech (aUPD 5p, aUPD 7q) nebylo možné zpětně potvrdit, zda jde o změny primární či sekundární, z důvodu nedostupnosti archivovaného materiálu odebraného v době diagnózy.

Většina sekundárních chromosomových abnormalit byla sporadická, pouze trisomie 8 (n=6) a monosomie 7 (n=2) byly pozorovány opakovaně, zároveň šlo

o nejčastější MDS specifické aberace. Kryptické změny byly aUPD 5p, aUPD 7q a nadpočetná kopie oblasti 17p12.

**Obrázek 23:** Přehled nalezených sekundárních chromosomových změn u pacientů skupiny 1



#### 4.4.2 Skupina 2 – jedna aberace

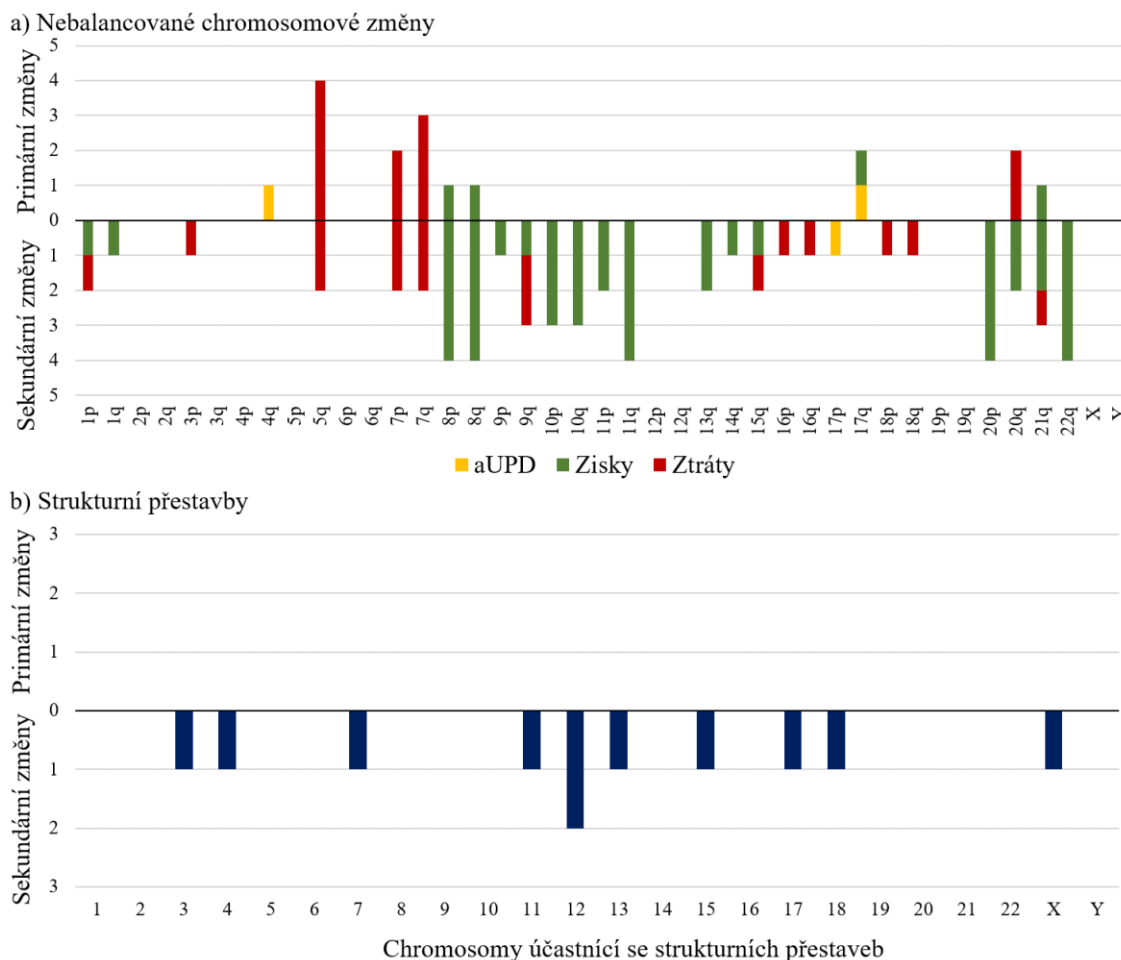
Ve skupině 2 bylo 14 pacientů s jednou chromosomovou aberací v době diagnózy (Obr. 24). Jako primární byly identifikovány jak aberace specifické pro MDS a/nebo AML (del(5q), n=4; del(7q)/-7, n=2; trisomie 8, n=1; del(20q), n=2; trisomie 21 s parciální delecí genu *RUNX1*, n=1; aUPD 4q, n=1), tak změny nespecifické pro tyto diagnózy (del(7)(q22), n = 1; aUPD 17q/del(17q), n = 2). Mezi primární kryptické změny patřily aUPD 4q (n=1), del(5q) (n=1), del(7q)/-7 (n=3), trisomie 8 (n=1), zisk 17q/aUPD 17q (n=2) a trisomie 21 s delecí *RUNX1* genu (n=1).

V průběhu evoluce patologického klonu bylo identifikováno 51 chromosomových aberací, s průměrem čtyři změny na pacienta (medián 2, rozmezí 1-11). Jedenáct z 51



identifikovaných změn bylo MDS specifických (del(5q), n=2; monosomie 7, n=2; trisomie 8, n=4; trisomie 11/zisk 11q, n=4). Více než polovina (55 %; 28/51) nespécifických chromosomových aberací byly aneuploidie celých chromosomů. Sedm abnormalit bylo kryptických: del(5q) (n=1), monosomie 7 (n=1), trisomie 8 (n=1), trisomie 11/zisk 11q (n=2), del(15q) (n=1) a aUPD 17p (n=1).

**Obrázek 24:** Přehled nalezených chromosomových změn u pacientů skupiny 2



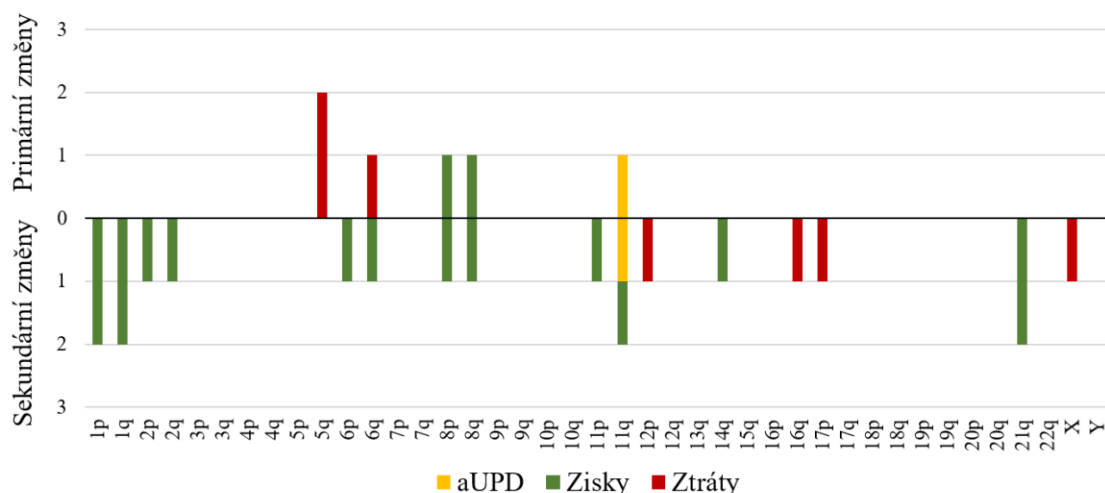
#### 4.4.3 Skupina 3 – dvě aberace

Do skupiny 3 byli zařazeni tři nemocní se dvěma primárními aberacemi v karyotypu (Obr. 25). Ve dvou případech šlo o del(5q) v kombinaci s další změnou (del(6q) a trisomie 8). U jedné pacientky byla klasickou cytogenetickou analýzou nalezena balancovaná translokace t(2;3)(p21;q26.3) a mikročipovou analýzou kryptická aUPD 11q.

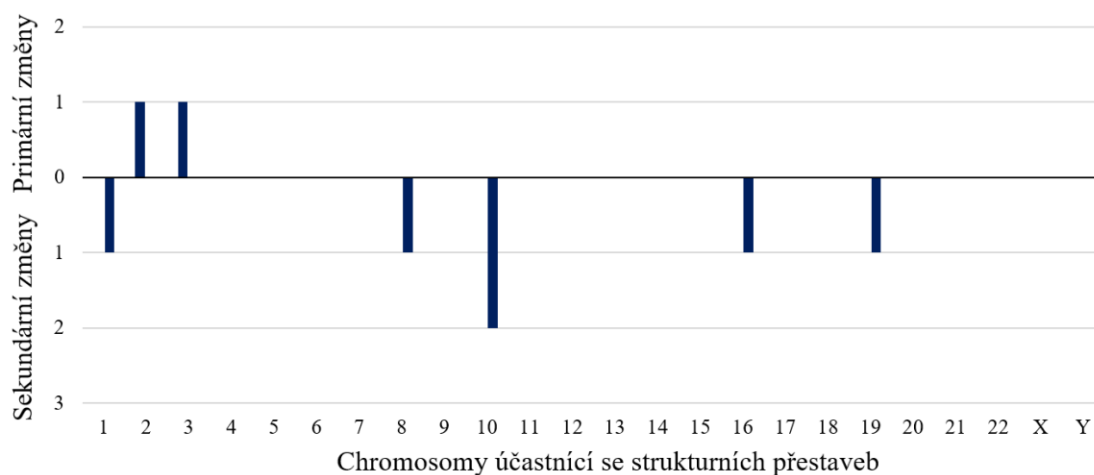
V průběhu klonálního vývoje bylo identifikováno dalších 20 chromosomových změn, v průměru sedm aberací na pacienta (medián 4, rozmezí 2-13). Z nich je s MDS/AML asociována trisomie chromosomu 8 (n=1), aUPD 11q (n=1) a trisomie 11 (n=1). Kryptické sekundární změny byly aUPD 11q, trisomie 11 a del(17p).

**Obrázek 25:** Přehled nalezených chromosomových změn u pacientů skupiny 3

a) Nebalancované chromosomové změny



b) Strukturní přestavby



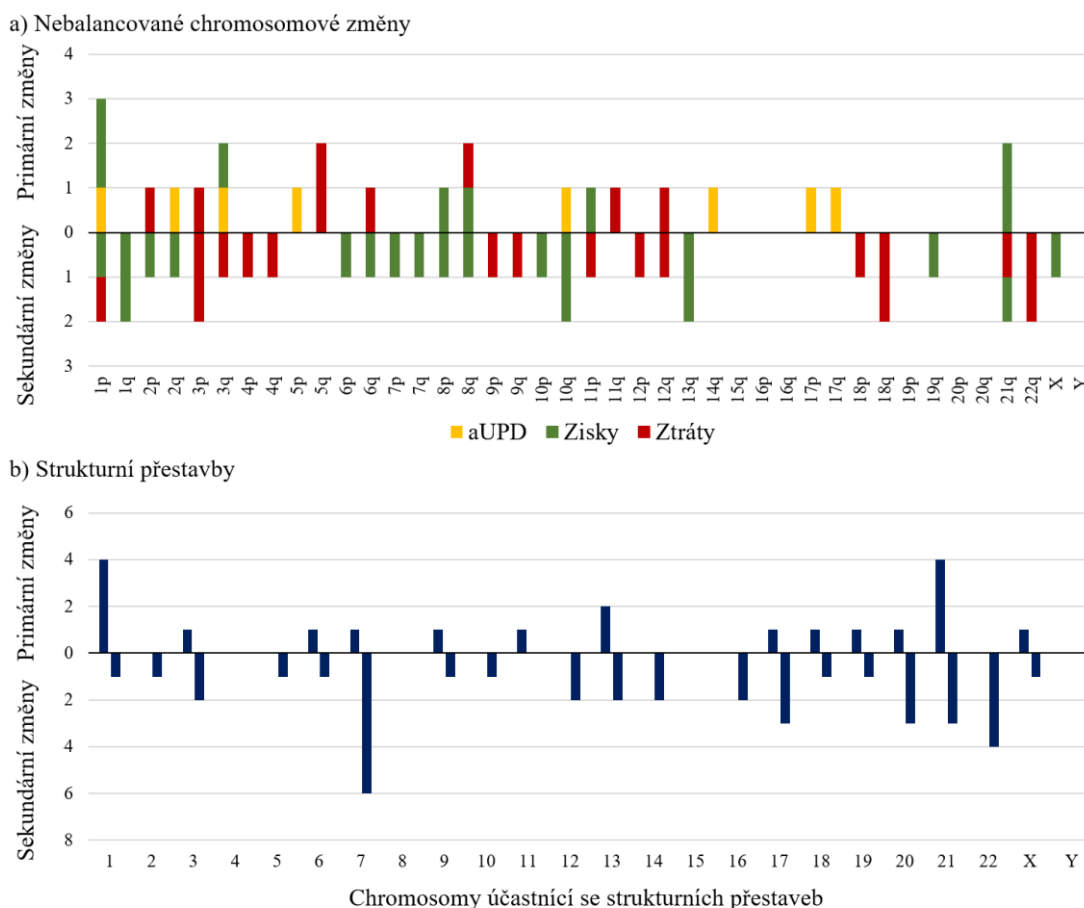
#### 4.4.4 Skupina 4 – tři a více změn

Ve skupině 4 bylo celkem sedm pacientů, u kterých byly prokázány komplexní chromosomové aberace již v době diagnózy (Obr. 26). V souboru bylo nalezeno 37 primárních změn, s průměrem pět aberací na jednoho nemocného (medián 5, rozmezí 3-7). Pouze tři z těchto změn byly specifické pro MDS: del(5q) (n=2), trisomie 8 (n=1)

a aUPD 17p (n=1). Kryptické primární změny této skupiny byly del(2p) (n=1), del(8q) (n=1), del(12q) (n=1) a aUPD 17p (n=1).

V progresi bylo identifikováno 60 sekundárních změn s průměrným počtem aberací na pacienta devět (medián 2, rozmezí 1-20). Většina změn získaných v průběhu klonálního vývoje byla nespecifická a pouze tři abnormality byly zařazeny mezi MDS specifické: kryptická přestavba *EVII* genu (n=1), trisomie 8 (n=1) a 21 (n=1). Ve skupině 4 byly nalezeny dvě kryptické sekundární změny: del(3p) (n=1) a del(22q) (n=1).

**Obrázek 26:** Přehled nalezených chromosomových změn u pacientů skupiny 4

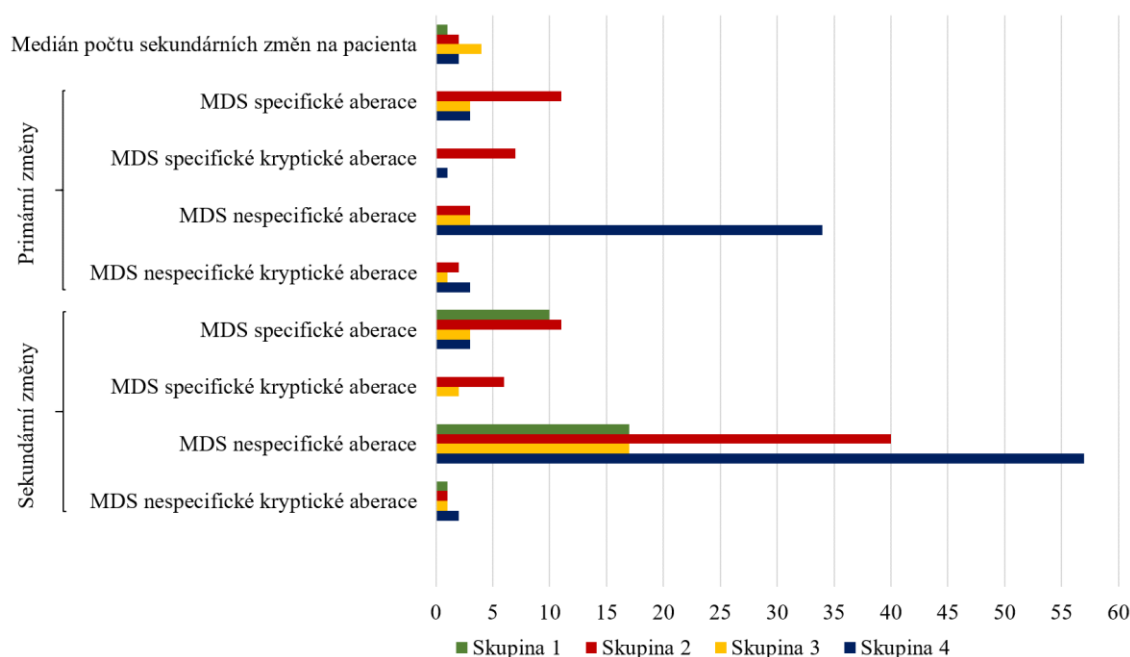


#### 4.4.5 Porovnání skupin

Nejvíce MDS specifických abnormalit v době diagnózy bylo prokázáno ve skupině 2 (n=11), stejně jako kryptických specifických změn (n=7) (Obr. 27). Naopak nejvíce nespecifických aberací v diagnostickém odběru bylo identifikováno ve skupině 4 (n=34), a to i kryptických (n=3).

Medián počtu sekundárních změn na pacienta byl nejvyšší ve skupině 3 (n=4). Nejvyšší počet sekundárních MDS specifických abnormalit byl pozorován ve skupině 2 (n=11), včetně kryptických (n=6). Nejvyšší počet nespecifických sekundárních změn byl zaznamenán ve skupině 4 (n=57), z toho kryptické byly pouze dvě.

**Obrázek 27:** Porovnání počtu chromosomových změn skupin 1-4

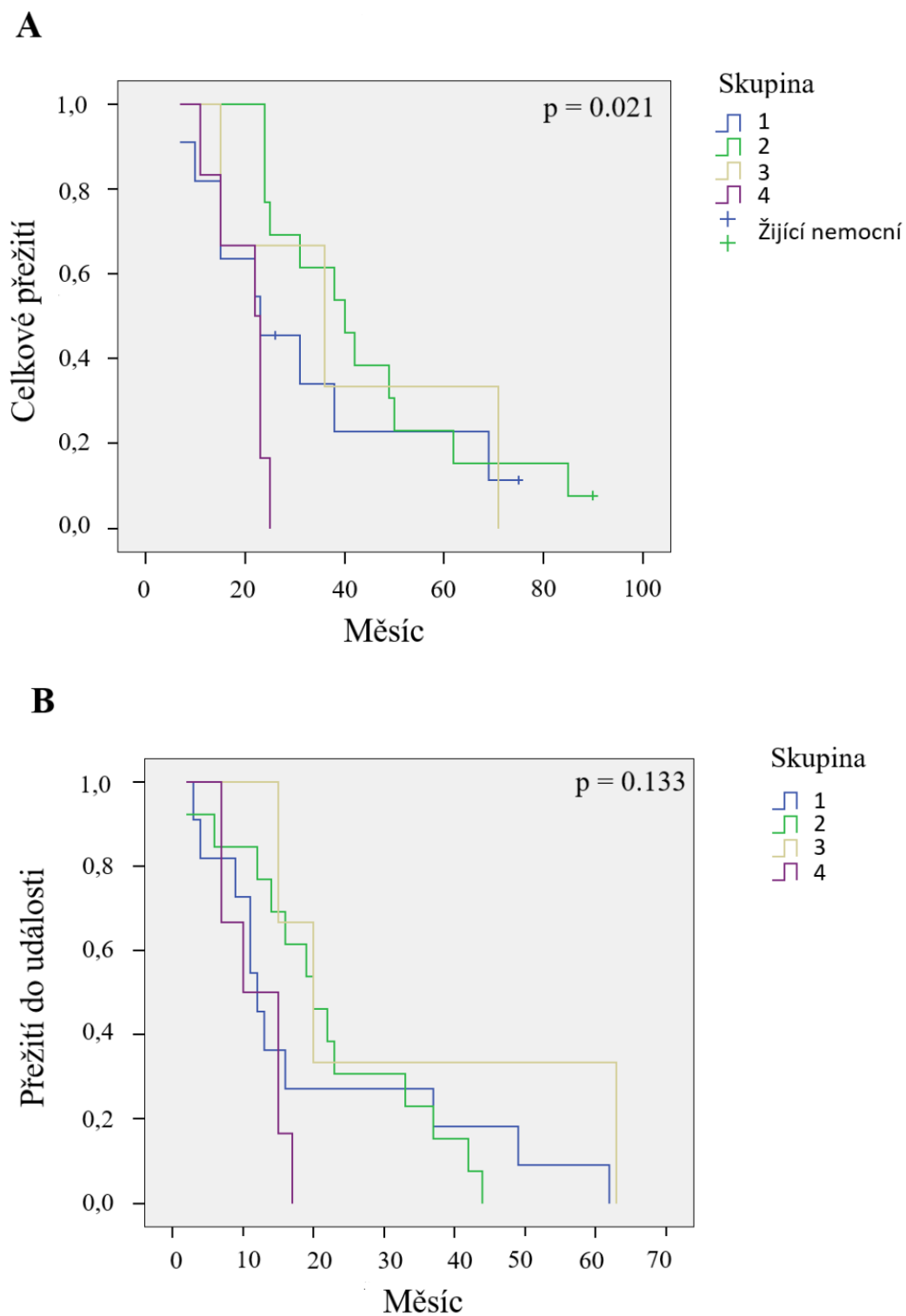


#### 4.4.6 Statistické analýzy

Do statistické analýzy přežití bylo zařazeno 33/36 pacientů. U nemocných č. 7, 11 a 32 nebyla k dispozici klinická data.

Počet pacientů rozdělených do skupin podle nálezů cytogenomickými metodami v době diagnózy byl následovný: (1) - normální karyotyp (10/33 nemocných), (2) - jedna změna (14/33 pacientů), (3) – dvě aberace (3/33 nemocných), (4) – tři a více změn (6/33 pacientů). Kaplan-Meierova analýza přežití prokázala, že OS ve skupinách pacientů 1–4 se statisticky významně liší ( $p = 0,021$ ), zejména u skupin 2 a 4 ( $p=0,001$ ) (Obr. 28A; tab. 11). Mezi skupinami nemocných 1-4 nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v EFS ( $p=0,133$ ) na zvolené hladině významnosti 0,05 (Obr. 28B). Coxovou vícerozměrnou regresní analýzou byly cytogenomické změny stanoveny jako významné prediktory OS ( $p=0,031$ ). Primární/sekundární MDS ( $p=0,038$ ) byly statisticky významným parametrem pro EFS.

**Obrázek 28:** Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití (A) a přežití do události (B) skupin pacientů 1-4 rozdělených podle cytogenomických nálezů v době diagnózy



**Tabulka 11a:** Porovnání celkového přežití skupin pacientů 1-4 rozdělených podle cytogenomických nálezů v době diagnózy

Skupina	Počet	Exitus	Žije	
			Počet	Procento
<b>1</b>	10	8	2	20 %
<b>2</b>	14	13	1	7,1 %
<b>3</b>	3	3	0	0 %
<b>4</b>	6	6	0	0 %
<b>Celkem</b>	33	30	3	9,1 %

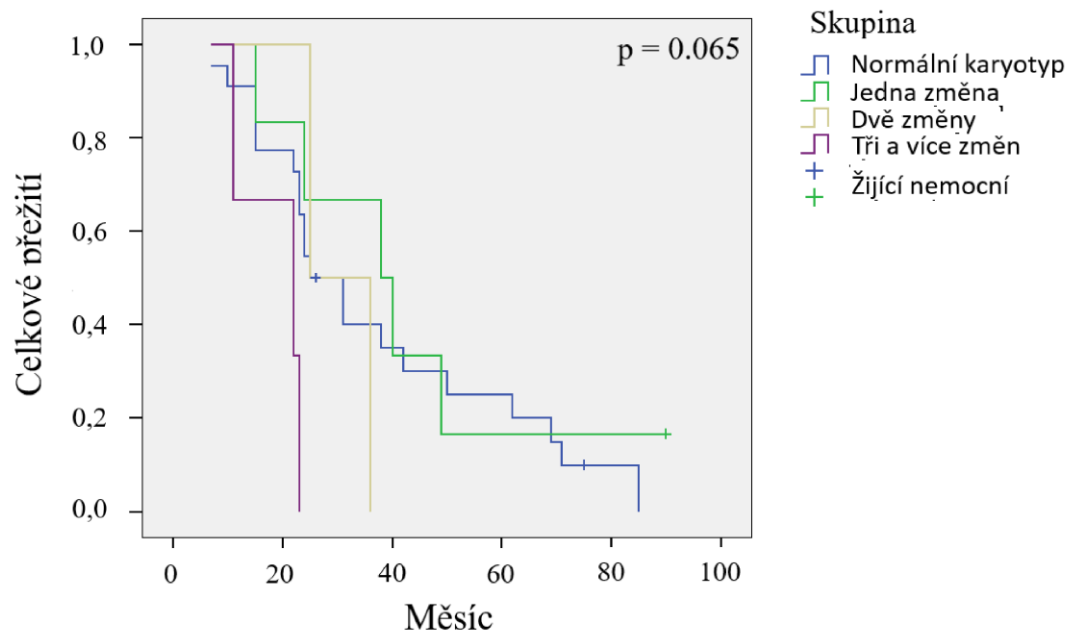
**Tabulka 11b:** Průměrná doba a medián celkového přežití skupin pacientů 1-4 rozdělených podle cytogenomických nálezů v době diagnózy

Skupina	Průměr		Medián	
	Odhad	Chyba	Odhad	Chyba
<b>1</b>	32,568	7,265	23,000	8,130
<b>2</b>	44,923	5,937	40,000	6,591
<b>3</b>	40,667	16,333	36,000	17,146
<b>4</b>	19,833	2,257	22,000	3,266
<b>Celkem</b>	36,277	4,081	25,000	3,220

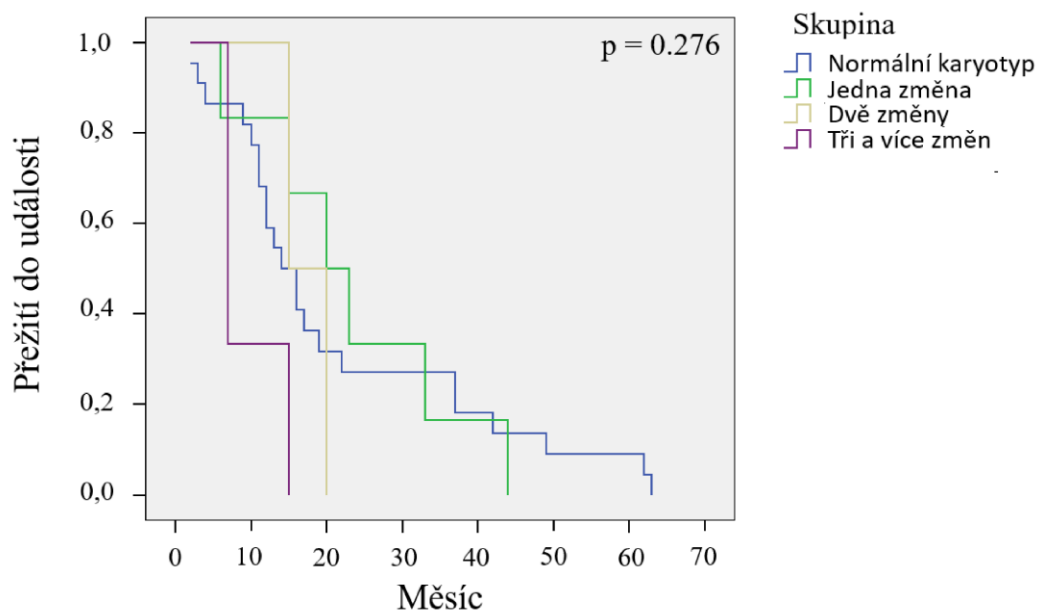
Za účelem posouzení vlivu kryptických aberací nalezených molekulárně-genetickými metodami na OS bylo 33/36 nemocných rozděleno do čtyř skupin podle cytogenomického nálezu pouze konvenčním G-pruhováním v době diagnózy následovně: normální karyotyp (22/33), jedna aberace (6/33), dvě změny (2/33) a tři a více abnormalit (3/33). Kaplan-Meierova analýza s Mantel-Coxovým testem přežití neprokázala statisticky významný rozdíl v OS ( $p=0,065$ ) a EFS ( $p=0,276$ ) mezi skupinami rozdělenými podle nálezu klasické cytogenetiky (Obr. 29).

**Obrázek 29:** Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití (A) a přežití do události (B) skupin pacientů rozdělených podle nálezů konvenční cytogenetiky v době diagnózy

**A**



**B**

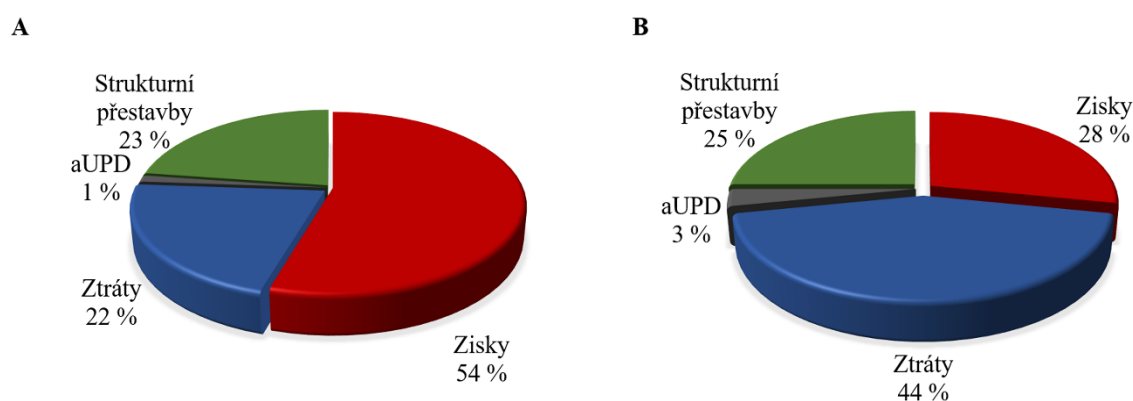


## 4.5 Vliv léčby na vznik klonálního vývoje

K posouzení potenciálního vlivu terapie na vznik nových chromosomových aberací v průběhu klonálního vývoje byli nemocní rozděleni do dvou skupin: klonální vývoj před léčbou (18/31) a po léčbě (13/31). U pěti pacientů nebylo možné získat klinická data.

U 18/31 (58 %) nemocných došlo ke klonálnímu vývoji před zahájením léčby, z toho tři pacientky nebyly v průběhu onemocnění léčeny vůbec (Tab. 12). Medián OS nemocných s klonálním vývojem před léčbou byl 26 měsíců (medián OS po zahájení léčby 4,5 měsíce). Medián doby od diagnózy do zahájení terapie byl 18,5 měsíce (6-66 měsíců). Léčba jednotlivých pacientů po vzniku klonálního vývoje byla následující: imunosupresivní terapie (n=1), chemoterapie (n=5), indukční chemoterapie (n=2), azacytidin (n=4), azacytidin s následnou chemoterapií a ASCT (n=1), ASCT (n=2), neléčena (n=3). Ve skupině nemocných s klonálním vývojem před léčbou bylo nalezeno celkem 110 sekundárních chromosomových změn, z toho osm kryptických. Nejvíce byly zastoupeny nadpočetné kopie celých chromosomů (n=39), z toho nejčastěji šlo o trisomie chromosomů 8 (n=5) a 21 (n=5) (Obr. 30).

**Obrázek 30:** Porovnání chromosomových aberací nalezených u MDS pacientů s klonálním vývojem před (A) a po léčbě (B)



Třináct z 31 (42 %) pacientů bylo léčeno již před nálezem klonálního vývoje s mediánem OS 25 měsíců (medián OS po zahájení léčby 18 měsíců) (Tab. 13). Medián doby od diagnózy do zahájení léčby byl 7 měsíců (0-36 měsíců), od nasazení léčby do klonálního vývoje byl medián 12 měsíců (2-34 měsíců). Léčba u jednotlivých nemocných byla následující: azacytidin (n=9), azacytidin a následná chemoterapie



(n=1), lenalidomid (n=2), lenalidomid, posléze azacytidin (n=1). Ve skupině bylo nalezeno 40 sekundárních aberací (pět kryptických). Nejpočetněji byly zastoupeny delece nebo ztráty celých chromosomů (n=14), opakovaně byla identifikována del(5q) (n=2) a monosomie 7 (n=2) (Obr. 30). Trisomie celých chromosomů byly prokázány pouze v sedmi případech, z toho se třikrát jednalo o trisomii 8.

**Tabulka 12:** Přehled léčebných postupů u MDS pacientů s klonálním vývojem před zahájením léčby

ID	Datum zahájení léčby	Léčba	Datum detekce klonálního vývoje	EFS (měsíc)	OS celkový (měsíc)	OS po zahájení léčby (měsíc)
5	3/2017	Imunosupresivní léčba	11/2016	62	75	9
6	-	Neléčena	4/2015	3	7†	-
7	10/2013	Chemoterapie (LD-ARA-C)	10/2013	30	ND	ND
8	8/2011	Chemoterapie (LD-ARA-C)	8/2011	11	15†	2
9	4/2014	Azacytidin	4/2014	49	69†	12
10	4/2016	ASCT	3/2016	4	26	20
13	10/2014; 3-5/2015	Azacytidin; chemoterapie + ASCT	8/2014	22	31†	7
16	-	Neléčena	1/2012	42	85†	-
17	5/2016	Chemoterapie (LD-ARA-C)	3/2016	33	38†	3
19	1/2011	Chemoterapie (Hydroxyurea, mercaptopurin)	1/2011	9	10†	1
21	12/2015	Azacytidin	11/2015	44	49†	2
22	1/2014	ASCT	7/2013	6	40†	29
29	6/2016	Indukční chemoterapie	5/2016	63	71†	7
30	3/2014	Azacytidin	9/2013	15	23†	2
31	2/2015	Chemoterapie (Hydroxyurea)	2/2015	10	15†	4
33	-	Neléčena	4/2014	17	23†	-
34	5/2016	Azacytidin	6/2015	7	22†	4
35	9/2013	Indukční chemoterapie	3/2013	7	11†	5

ID = identifikační číslo pacienta; EFS = přežití do klonálního vývoje; OS = celkové přežití; LD-ARA-C = nízké dávkovaný cytarabin; ASCT = alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk; ND = klinická data nejsou k dispozici; † = pacient zemřel

**Tabulka 13:** Přehled léčebných postupů u MDS pacientů s klonálním vývojem po zahájení léčby

ID	Datum zahájení léčby	Léčba	Datum detekce klonálního vývoje	EFS (měsíc)	OS celkový (měsíc)	OS po zahájení léčby (měsíc)
1	2/2015	Azacytidin	4/2015	11	23†	14
3	8/2010	Azacytidin	1/2012	12	15†	15
12	3/2012	Azacytidin	6/2013	16	31†	20
15	5/2009	Azacytidin	5/2010	19	24†	17
18	9/2015	Lenalidomid	12/2015	23	24†	4
20	6/2010	Azacytidin	4/2013	37	50†	48
23	4/2014	Azacytidin, posléze chemoterapie (LD-ARA-C)	9/2014	16	42†	31
24	4/2014;6/2014	Lenalidomid; Azacytidin	11/2014	14	62†	26
25	1/2013	Azacytidin	7/2013	12	24†	18
26	9/2010	Lenalidomid	2/2012	20	90	87
27	11/2013	Azacytidin	12/2014	15	15†	13
28	3/2013	Azacytidin	11/2014	20	36†	34
36	12/2012	Azacytidin	8/2013	15	25†	16

ID = identifikační číslo pacienta; EFS = přežití do klonálního vývoje; OS = celkové přežití; LD-ARA-C = nízké dávkovaný cytarabin; † = pacient zemřel

## 5 DISKUZE

Klonální vývoj patologického klonu je vícestupňový proces, při kterém dochází k postupnému hromadění chromosomových aberací nebo genových mutací v průběhu onemocnění. Tento jev je u pacientů s MDS asociován s horší prognózou a kratším celkovým přežitím nemocných.

Předkládaná studie byla zaměřena na studium lineárního klonálního vývoje (dále jen klonální vývoj), tedy zisku nových genomových změn v čase u pacientů s diagnózou MDS. V rámci výzkumu byly u nemocných detailně analyzovány chromosomové abnormality nalezené jak v době diagnózy, tak v průběhu onemocnění. Cílem byla identifikace genomových oblastí, ve kterých dochází ke vzniku primárních a/nebo sekundárních změn a posouzení, zda tyto aberace souvisí s progresí patologického klonu nebo zda vznikly v důsledku léčby.

U MDS je klonální vývoj popisován u cca 8-39 % pacientů (Horiike S *et al.*, 1988; White AD *et al.*, 1994; Tien H-F *et al.*, 1995; Haase D *et al.*, 2007; Wang H *et al.*, 2010; Bernasconi P *et al.*, 2010; Neukirchen J *et al.*, 2017; Schanz J *et al.*, 2018b; Feurstein S *et al.*, 2018). Široké rozmezí procentuálního zastoupení klonálního vývoje u MDS je pravděpodobně způsobeno heterogenitou studovaných skupin, variabilní délkou sledování i rozdíly v použitých vyšetřovacích metodách. Neukirchenová a kolegové například ve své studii zaměřené na soubor čítající 549 MDS pacientů pozorovali klonální vývoj ve 24 % případů (Neukirchen J *et al.*, 2017). Tato studie však porovnávala pouze výsledky klasické cytogenetické analýzy a změny prokázané v průběhu onemocnění zpětně nepotvrzovala v diagnostickém vzorku. Schanzová a kol. kombinací G-pruhování a mFISH identifikovali klonální vývoj u 8 % případů v souboru 729 nemocných (Schanz J *et al.*, 2018b). V tomto souboru byli zařazeni nejen pacienti s diagnózou MDS, ale i se sekundární AML. Feursteinová a kolektiv se ve své studii zaměřili výlučně na nemocné s MDS s izolovanou del(5q), u nichž klonální vývoj pozorovali v 8 % případů (Feurstein S *et al.*, 2018). Pro analýzu chromosomových změn využili klasickou cytogenetickou analýzu, I-FISH a mFISH. Stejná frekvence klonálního vývoje byla pozorována i v předkládané studii.

Mezi lety 2007-2017 bylo v Centru nádorové cytogenomiky vyšetřeno celkem 469 pacientů s MDS, u nichž byly k dispozici minimálně dva odběry KD nebo PK, jeden v době diagnózy a jeden či více v průběhu onemocnění. U 36 (8 %) nemocných byl pomocí cytogenomických analýz potvrzen klonální vývoj. Kombinace použitých

metod tedy v souladu s předchozími studiemi zajišťuje detailnější analýzu chromosomových změn, identifikaci kryptických aberací a zpřesňuje incidenci klonálního vývoje v souboru.

Z 36 nemocných s klonálním vývojem bylo 17 mužů a 19 žen. Zastoupení odpovídá údajům publikovaným v literatuře, které uvádí, že onemocnění je častější u mužů, s výjimkou MDS s izolovanou  $\text{del}(5q)$ , který je typičtější nálezem u žen (Greenberg PL *et al.*, 2011; Feurstein S *et al.*, 2018). Ve studovaném souboru bylo pět žen a jeden muž s diagnózou MDS s izolovanou  $\text{del}(5q)$ , ostatní subtypy MDS byly diagnostikovány u 16 mužů a 14 žen.

Medián věku pacientů byl v době diagnózy 68,5 roku (rozmezí 29 až 83 let), přičemž 75 % nemocných bylo starších 60 let. Obecně je MDS diagnózou vyššího věku a incidence onemocnění se se vzrůstajícím věkem zvyšuje (Sekeres MA *et al.*, 2006; Ma X *et al.*, 2007; Rollison DE *et al.*, 2008; Sandhu SK a Sekeres MA, 2008; Červinek L, 2015). Vzhledem k celkovému stárnutí současné populace je proto v budoucnu očekáván značný nárůst výskytu MDS. Zároveň s ohledem na problematickou diagnostiku této vysoce heterogenní choroby a výskyt rekurentních mutací u potenciálně zdravé populace nad 65 let související s CHIP a podobnými diagnózami je výzkum MDS jednou z priorit hematologů (Steensma DP *et al.*, 2015).

Jednoznačně nejčastější diagnózou v době prvního odběru vzorku ve studovaném souboru byla MDS-MLD (16/36). U pěti pacientů (14 %) byla choroba diagnostikována jako sekundární po léčbě jiného onemocnění (karcinom kolorekta, karcinom endometria, karcinom prsu, karcinom prostaty, myeloproliferativní onemocnění) s celkovým přežitím mezi 15 až 36 měsíci. Sekundární MDS je diagnostikován zhruba u 10 % případů a je spojen s kratším celkovým přežitím kolem 18 měsíců (Barzi A a Sekeres MA, 2010; Nazha A *et al.*, 2015b). U 31 nemocných šlo o primární formu MDS.

Celkem bylo ve studovaném souboru cytogenomickými metodami prokázáno 213 chromosomových změn. Konvenční cytogenetickou analýzou bylo nalezeno 31 primárních a 142 sekundárních aberací. Molekulárně-genetickými metodami bylo identifikováno 42 kryptických změn, z toho 14 bylo prokázáno až v průběhu onemocnění a byly označeny jako sekundární. Mezi primární kryptické abnormality bylo zařazeno 26 chromosomových změn, které byly zpětně nalezeny i v diagnostickém vzorku.

Identifikace kryptických abnormalit v době diagnózy může mít zásadní význam při posuzování prognózy pacienta. Příkladem lze uvést nemocného č. 15. Klasickou cytogenetickou analýzou bylo u pacienta analyzováno 22 mitos bez patologického nálezu. Podle IPSS-R měl tedy nemocný dobrou prognózu s předpokládaným mediánem přežití 48 měsíců. I-FISH však prokázala přítomnost klonu s monosomií chromosomu 7, která je spojena se špatnou prognózou. Tomu odpovídá i celková doba přežití nemocného č. 15, která byla 24 měsíců.

Za použití cytogenomických metod bylo identifikováno 57 primárních chromosomových změn v době diagnózy, z toho 18 (32 %) MDS specifických a 39 (68 %) nespecifických. Podíl aberací specifických pro MDS byl v době diagnózy vyšší než u abnormalit nalezených během klonálního vývoje.

Obecně nejčastějšími primárními aberacemi jsou  $\text{del}(5q)$ ,  $\text{del}(7q)/-7$ ,  $\text{del}(20q)$  a ztráta chromosomu Y (Greenberg P *et al.*, 1997; Schanz J *et al.*, 2011; Greenberg P *et al.*, 2012). Nejčastější primární aberací ve studovaném souboru nemocných byla v souladu s literaturou  $\text{del}(5q)$  ( $n=8$ ), zároveň šlo i o nejpočetnější MDS specifickou abnormalitu v době diagnózy. U poloviny pacientů šlo o jedinou změnu v karyotypu, dva nemocní měli jednu další aberaci ( $\text{del}(6q)$ , trisomie 8) a u dvou byla součástí komplexních změn karyotypu. S výjimkou dvou nemocných s komplexním karyotypem, lze zbývající pacienty zařadit do prognostické skupiny s dobrou prognózou s předpokládanou dobou přežití 48 měsíců. Medián celkového přežití u zmíněných šesti pacientů se samostatnou  $\text{del}(5q)$  nebo jednou další aberací byl 40 měsíců (rozmezí 24-90 měsíců).

Klonální vývoj u pacientů s  $\text{del}(5q)$  byl dříve pozorován zhruba v 8 % případů (Feurstein S *et al.*, 2018). Příčiny klonálního vývoje u nemocných s dobrou prognózou nejsou dosud zcela objasněny. Je však známo, že získ nových chromosomových aberací u těchto pacientů je asociován s progresí onemocnění a častým vznikem komplexních změn (Haase D *et al.*, 2007; Göhring G *et al.*, 2012). Podobně v našem souboru u pěti ze šesti nemocných s  $\text{del}(5q)$  došlo v průběhu klonálního vývoje k rozvoji komplexních aberací. Výjimkou byla pacientka č. 26, u které byla v době progresu nalezena kryptická delece krátkých ramen chromosomu 1 a jejíž celkové přežití bylo 90 měsíců. Jednou z možných příčin progresu mohou být mutace genu *TP53*, které jsou u MDS s nízkým rizikem asociovány se zkracováním telomer, klonálním vývojem a transformací do AML (Jädersten M *et al.*, 2011; Göhring G *et al.*, 2012; Welch JS *et al.*, 2012). Zároveň Beličková a kolektiv prokázali, že progresu onemocnění nesouvisí jen s přítomností

mutace, ale je ovlivněna i mutační náloží (Belickova M *et al.*, 2016). Pacienti, jejichž mutační nálož je menší než 6 % (OS 138 měsíců), mají signifikantně delší celkovou dobu přežití, než nemocní s vyšším procentuálním zastoupením mutace genu *TP53* ve vzorku (OS 43,5 měsíce).

U 14 z 36 pacientů bylo prokázáno celkem 26 kryptických chromosomových změn již v době diagnózy. Osm kryptických primárních aberací bylo MDS specifických, z nich nejpočetnější byla del(5q) (n=2) a monosomie 7 (n=2). U sedmi nemocných s původně normálním karyotypem a u dvou pacientů s neinformativní cytogenetikou byla identifikována jedna kryptická abnormalita v době diagnózy a u jednoho dvě změny. Medián OS nemocných byl 36,5 měsíce (rozmezí 10 až 85). Nález kryptických primárních změn byl u čtyř nemocných spojen s komplexními aberacemi s mediánem OS 19 měsíců (rozmezí 11 až 25).

Ze 156 sekundárních aberací, nalezených v průběhu klonálního vývoje, bylo 32 (21 %) MDS specifických a zbývajících 124 (79 %) nespecifických. Vysoký podíl nespecifických změn vznikajících v průběhu onemocnění pravděpodobně odráží zvyšující se genomovou nestabilitu maligního klonu, jejímž důsledkem jsou náhodné změny, které nemusí nutně představovat pro buňku růstovou výhodu.

V době klonálního vývoje byla nejčastější změnou trisomie/tetrasomie chromosomu 8 (n=12). Trisomie 8 byla zároveň i nejpočetnější MDS specifickou sekundární změnou v tomto souboru (n=11). Trisomie/tetrasomie 8 jsou nejčastěji udávanou změnou vznikající v průběhu klonálního vývoje (Kameoka J *et al.*, 2001; Bernasconi P *et al.*, 2010; Angelova S *et al.*, 2015; Schanz J *et al.*, 2018b). Její vliv na prognózu nemocných zatím není přesně znám. Druhou velmi často zmiňovanou aberací je del(7q)/-7, která je i v průběhu klonálního vývoje často spojena se vznikem komplexních aberací (Schanz J *et al.*, 2018b). Monosomie 7 byla v našem souboru pozorována u čtyř pacientů, u tří z nich jako součást komplexního karyotypu. Častěji však tento chromosom vstupoval do strukturních přestaveb spojených s výrazným nárůstem dalších chromosomových abnormalit (n=6).

Ze 14 sekundárních kryptických změn bylo devět MDS specifických. Nejčastější byly aberace chromosomu 11 (nadpočetné kopie 11/11q, n=3; aUPD 11q, n=1). Nadpočetné kopie případně strukturní přestavby 11q jsou spojovány s alteracemi genu *MLL* a jsou asociovány s progresí MDS do AML (Rücker FG *et al.*, 2006; Šárová I *et al.*, 2010; Sarova I *et al.*, 2013).

Ve studovaném souboru bylo celkem identifikováno 14 aUPD u sedmi pacientů postihujících chromosomy 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 14, 17. Jedenáct z nich bylo potvrzeno již v době diagnózy, u jedné došlo v průběhu klonálního vývoje ke změně velikosti zasažené oblasti (aUPD 11q), jedna byla prokázána v době progresu (aUPD 17p) a u dvou (aUPD 5p a aUPD 7q) nebylo možné určit dobu jejich vzniku pro nedostatek diagnostického materiálu. Většina oblastí byla sporadická a nespecifická pro MDS.

Pacientka č. 33 měla původně normální karyotyp, pomocí aCGH/SNP však bylo prokázáno sedm oblastí aUPD postihujících chromosomy 1, 2, 3, 5, 10, 14 a 17 (OS 23 měsíců). Žádná z těchto oblastí v současné době není specifická pro MDS a není asociována s mutacemi rekurentních genů. Nález takového množství aUPD u jednoho pacienta však může souviset s vysokou nestabilitou genomu maligních buněk nebo chybami v reparačních mechanismech DNA.

Oblasti aUPD nejsou v současném prognostickém systému IPSS-R zahrnuty, v literatuře se však uvádí několik specifických aUPD (1p, 4q, 7q, 11q, 13q, 17p, 19q a 21q), které jsou asociovány s homozygotními mutacemi rekurentních genů a u kterých je prokázán negativní vliv na prognózu nemocných (Fitzgibbon J *et al.*, 2005; Raghavan M *et al.*, 2005; Dunbar AJ *et al.*, 2008; Szpurka H *et al.*, 2009; Jankowska AM *et al.*, 2009; Langemeijer SMC *et al.*, 2009; Jasek M *et al.*, 2010; Ernst T *et al.*, 2010; O'Keefe C *et al.*, 2010).

Oblasti aUPD spojené s diagnózou MDS byly identifikovány u pěti nemocných: aUPD 4q (n=1), aUPD 7q (n=1), aUPD 11q (n=1) a aUPD 17p (n=2). Tyto aUPD jsou asociovány s homozygotními mutacemi genů *TET2* (4q24), *EZH2* (7q36.1) *c-CBL* (11q23.3) a *TP53* (17p13) (Dunbar AJ *et al.*, 2008; Jankowska AM *et al.*, 2009; Ernst T *et al.*, 2010; Jasek M *et al.*, 2010). Ve všech případech byla prokázána homozygotní mutace studovaného genu. Mutace genu *EZH2* byla vyhodnocena jako benigní, zbývající nalezené mutace jsou v současné době považovány za patogenní či pravděpodobně patogenní.

U nemocné č. 19 s aUPD(4)(q21.21qter) byla potvrzena homozygotní mutace genu *TET2*. Jak již bylo zmíněno v úvodu, homozygotní mutace genu *TET2* je popisována až u 26 % případů MDS (Bejar R *et al.*, 2011b). Ztráta obou alel pravděpodobně přispívá k patogenezi choroby. Prognostický význam mutace genu *TET2* není znám, ale je asociována s lepší odpovědí na léčbu HMA (Itzykson R *et al.*, 2011; Bejar R *et al.*, 2014).

Pacienti č. 22 a č. 35 s aUPD 17p měli homozygotní mutace genu *TP53* v kombinaci s komplexním karyotypem buď v době diagnózy nebo v průběhu onemocnění. Asociace mutací genu *TP53* s komplexními změnami karyotypu je známa již z předchozích studií (Jasek M *et al.*, 2010; Svobodova K *et al.*, 2016).

U nemocného č. 22 byla kvůli aUPD 17p a homozygotní mutaci *TP53*, které byly spolu s komplexními změnami prokázány v době klonálního vývoje, provedena retrospektivní analýza diagnostického odběru. V době diagnózy byla u pacienta původně nalezena pouze del(5q), nicméně při retrospektivním vyšetření byla i v tomto vzorku zpětně prokázána mutace *TP53*. Ta mohla být jednou z příčin vzniku komplexních změn karyotypu a progresu onemocnění u pacienta s původně dobrou prognózou (Jädersten M *et al.*, 2011; Göhring G *et al.*, 2012; Welch JS *et al.*, 2012).

U pacientky č. 27 byla v průběhu klonálního vývoje prokázána změna velikosti a rozsahu aUPD 11q, podobně se navýšila i klonální nálož mutace genu *c-CBL*. Dosud byl tento proces vzniku aUPD, jehož důsledkem je změna heterozygotního stavu mutace na homozygotní a ztráta funkce obou alel genu, zaznamenán a popsán pouze u pacientů s AML v relapsu (Raghavan M *et al.*, 2008). Podobně jako u AML pacientů lze i v případě nemocných s MDS předpokládat, že je aUPD jeden z mechanismů zodpovědných za vznik a vývoj onemocnění.

Studovaný soubor byl rozdělen do čtyř skupin podle nálezu chromosomových aberací detekovaných cytogenomickými metodami v době diagnózy.

Ve skupině 1 bylo 12 nemocných s normálním karyotypem bez chromosomových změn v době diagnózy. V průběhu onemocnění bylo nalezeno 27 nově vzniklých sekundárních změn, z toho nejčtenější změny byly trisomie 8 (n=6) a monosomie 7 (n=2). Zároveň šlo o nejčastější MDS specifické změny. Do skupiny 2 bylo zařazeno 14 pacientů s jednou chromosomovou změnou v diagnostickém odběru. Nejčastější primární změnou a zároveň i MDS specifickou byla del(5q) (n=4). V rámci klonálního vývoje bylo identifikováno 51 aberací. Nejčtenější změnou byla trisomie 8 (n=4), ta byla zároveň i nejčastější MDS specifickou aberací. Ve skupině 3 byly tři pacienti se dvěma primárními aberacemi. U dvou nemocných byla prokázána del(5q) v kombinaci s jednou další změnou (del(6q), a trisomie 8). Jedna pacientka měla balancovanou translokaci t(2;3)(p21;q26.3) a aUPD 11q v diagnostickém vzorku. V průběhu onemocnění bylo identifikováno dalších 20 chromosomových změn. Mezi sekundárními změnami nebyly prokázány žádné často se opakující aberace. Do skupiny 3 však byli zařazeni pouze tři nemocní a nelze vyloučit nález případných rekurentních změn ve



větším souboru pacientů. Skupina 4 měla již v době diagnózy prokázán komplexní karyotyp a bylo do ní zařazeno sedm nemocných. V diagnostickém vzorku bylo u pacientů prokázáno 37 chromosomových změn, přičemž pouze tři aberace byly MDS specifické. Během klonálního vývoje bylo prokázáno 60 abnormalit, z nichž většina byla nespecifická pro MDS nebo AML.

Porovnáním skupin jsme zjistili, že nejvíce MDS specifických primárních aberací ( $n=11$ ) a zároveň i kryptických specifických změn ( $n=7$ ) bylo prokázáno ve skupině 2. Nejvíce nespecifických primárních abnormalit jsme identifikovali ve skupině 4 ( $n=34$ ), stejně tak i nejvíce kryptických ( $n=3$ ).

Počet sekundárních chromosomových změn ve skupinách byl přímo úměrný komplexitě nálezu v době diagnózy. Ve skupině 1 byl nejvyšší počet aberací na pacienta devět, ve skupině 4 už bylo u jednoho nemocného nalezeno 20 abnormalit karyotypu získaných v průběhu onemocnění. Nejvyšší medián počtu sekundárních změn na pacienta byl ve skupině 3 ( $n=4$ ), v této skupině však byly pouze tři nemocní. Nejvyšší počet sekundárních MDS specifických změn ( $n=11$ ), včetně kryptických ( $n=6$ ) byl prokázán ve skupině 2. Nejvíce nespecifických sekundárních aberací bylo pozorováno ve skupině 4 ( $n=57$ ), kryptické byly pouze dvě.

Do statistických analýz bylo zahrnuto 33/36 pacientů, u kterých byla k dispozici klinická data. Soubor nemocných byl rozdělen podle nálezu aberací prokázaných cytogenomickými metodami v diagnostickém vzorku do čtyř skupin (1 – normální karyotyp, 2 – jedna aberace, 3 – dvě změny, 4 – tři a více abnormalit). Prokázali jsme významný statistický rozdíl v OS ( $p=0,021$ ) mezi skupinami nemocných, konkrétně mezi skupinami 2 a 4. Ve skupinách 1-4 nebyl rozdíl v EFS statisticky významný ( $p=0,133$ ). Jako významné prediktory OS byly stanoveny cytogenomické změny v době diagnózy ( $p=0,031$ ). Významným parametrem pro EFS byly primární/sekundární MDS ( $p=0,038$ ). Pro posouzení prognostického vlivu nalezených kryptických změn v době diagnózy byl stejný soubor nemocných rozdělen do čtyř skupin podle aberací nalezených pouze konvenční cytogenetickou analýzou. Mezi těmito skupinami nebyl potvrzen statisticky významný rozdíl v OS ( $p=0,065$ ) a EFS ( $p=0,276$ ).

Pro účely posouzení potenciálního vlivu léčby na vznik nových chromosomových změn byl soubor 31 nemocných rozdělen podle toho, zda došlo ke klonálnímu vývoji před zahájením terapie nebo až po ní do dvou skupin: klonální vývoj před léčbou (18/31; 58 %) a po léčbě (13/31; 42 %). Pět nemocných bylo vyřazeno z důvodu nedostupnosti klinických dat.

Ve skupině s klonálním vývojem před léčbou bylo 18 pacientů, z toho tři nebyli léčeni vůbec. Skupina s klonálním vývojem po léčbě zahrnovala 13 nemocných. V následujícím textu jsou v závorkách uváděny skupiny vždy ve stejném pořadí: klonální vývoj před léčbou a klonální vývoj po léčbě. Mezi těmito skupinami nebyl pozorován výrazný rozdíl v mediánu OS pacientů (OS 26, respektive 25 měsíců), ani v mediánu doby od diagnózy do identifikace klonálního vývoje (OS 16, respektive 16 měsíců). Byly však pozorovány rozdíly v mediánu doby od diagnózy do nasazení léčby (18,5, respektive 7 měsíců) a v mediánu délky přežití po zahájení léčby (OS po zahájení léčby 4,5, respektive 18 měsíců). Medián doby od zahájení léčby do vzniku nových chromosomových změn byl u skupiny s klonálním vývojem po léčbě 12 měsíců.

Nemocní, u kterých došlo ke klonálnímu vývoji před terapií, byli následně léčeni imunosupresivními léky, chemoterapií, azacytidinem (samostatně i v kombinaci s ASCT) a ASCT. Naopak skupina, ve které došlo ke klonálnímu vývoji až po léčbě, byla téměř výhradně léčena azacytidinem nebo lenalidomidem, případně jejich kombinací.

Azacytidin je v posledních deseti letech nejčastěji užívanou terapií, především u starších nemocných s pokročilými MDS, kteří nejsou kandidáty k ASCT (Čermák J, 2019). V našem souboru bylo 40 % pacientů léčeno tímto hypometylačním preparátem. HMA zlepšuje krátkodobou prognózu nemocných, tři roky však přežívá pouze 26 % pacientů ve srovnání s 49 % u nemocných po ASCT (Cermak J *et al.*, 2018). Přesto azacytidin představuje zásadní zlepšení v léčbě MDS s OS 16,9 měsíce ve srovnání s nemocnými léčenými kombinovanou chemoterapií nebo podpůrnou léčbou s přežitím 7,5 měsíce (Jonášová A *et al.*, 2013).

Podobně v posledním desetiletí zasáhl do úspěšnosti léčby lenalidomid. Ten je specificky spojen s dosažením nezávislosti na transfúzích až u 90 % pacientů s MDS s izolovanou del(5q) (Neuwirtová R *et al.*, 2009; Jonasova A *et al.*, 2018). I u nemocných léčených lenalidomidem se však objevují případy nereagující na léčbu. Poslední studie tyto skutečnosti spojují zejména s mutacemi genu *TP53* (Belickova M *et al.*, 2016; da Silva-Coelho P *et al.*, 2017; Jonasova A *et al.*, 2018).

Nejvyšší výskyt klonálního vývoje byl dosud zaznamenán u pacientů léčených intenzivní chemoterapií a HMA (Jabbour E *et al.*, 2013). Nicméně je popisován s různou incidencí u všech typů léčby a dosud u žádného léčiva nebyl spojen se vznikem konkrétního typu aberací.

Klonální vývoj, ke kterému došlo u pacientů před léčbou, byl v našem souboru charakteristický ziskem chromosomového materiálu (54 %), zejména nadpočetnými kopiemi celých chromosomů (n=39). Nejčastěji byly pozorovány trisomie chromosomů 8 (n=5) a 21 (n=5). Podle Angelové a kolegů by patologický potenciál těchto změn mohl spočívat v nadpočetných kopiích genů *c-MYC* (8q24) a *RUNX1* (21q22), jejich prognostický význam však zůstává nejasný (Kameoka J *et al.*, 2001; Bernasconi P *et al.*, 2010; Angelova S *et al.*, 2015; Schanz J *et al.*, 2018b).

U pacientů s klonálním vývojem po léčbě byly mezi sekundárními aberacemi nejpočetněji zastoupeny ztráty chromosomového materiálu (44 %). Opakovaně byly v dané skupině pozorovány monosomie 7 (n=2) a del(5q) (n=2). I přes vysoký podíl monosomií/delecí ve skupině MDS pacientů s klonálním vývojem po léčbě byla nejčastěji se opakující změnou trisomie 8 (n=3).

Trisomie chromosomu 8 je nejčtenější změnou v obou skupinách pacientů s klonálním vývojem před i po léčbě. Pravděpodobně tedy zahájení terapie u nemocného nemá vliv na vznik této abnormality. Z dostupných studií vyplývá, že dosud není zcela objasněn původ této změny (vrozená/somatická aberace), ani její vliv na patologii buněk a prognózu nemocných (Nielsen J a Wohler M, 1991; Seghezzi L *et al.*, 1996; Maserati E *et al.*, 2002; Brunning RD *et al.*, 2008; Saumell S *et al.*, 2015). Zároveň se jedná o jednu z aberací, které samy o sobě nejsou dostačující k potvrzení diagnózy MDS bez splnění diagnostických kritérií dysplázie.

Metody klasické cytogenetiky jsou v současné době zlatým standardem při vyšetřování buněk KD a při detekci chromosomových abnormalit v karyotypu nemocných. Konvenční cytogenetika má však rozlišení pouze 5-10 Mb. Tento nedostatek je částečně schopna překonat I-FISH, která detekuje nebalancované změny již v řádu několika kb. Jde však o metodu využívající cíleně lokus-specifické sondy zaměřené na konkrétní rekurentní oblasti. Doplnující metodou by se mohla stát aCGH/SNP, která je schopna identifikovat nebalancované aberace celého genomu v jedné analýze s rozlišením několika kb (>350 kb) a umožňuje tak záchyt kryptických změn. Zároveň detekuje rovněž aUPD od velikosti 5 Mb. Již Gronseth a kolegové poukazovali, že současná WHO klasifikace nezohledňuje prognostický význam nálezů aCGH/SNP (Gronseth CM *et al.*, 2015). Naše studie, v souladu s publikovanou literaturou, ukazuje že kryptické aberace identifikované cytogenomickými metodami, mají prognostický význam a signifikantně ovlivňují celkové přežití nemocných s MDS.

Aktuální prognostické systémy se na dynamiku MDS a změny získané v průběhu onemocnění nezaměřují. Studium klonálního vývoje však odhaluje, že je zde celá řada faktorů ovlivňujících prognózu a celkové přežití takovýchto pacientů a že je proto do budoucna nutné vytvořit stratifikační systém, který bude reflektovat i průběh onemocnění MDS (Schanz J *et al.*, 2018b). Stejně tak je zřejmé, že cytogenetické vyšetření není důležité jen v začátku choroby, ale přináší velmi důležité informace i v jejím průběhu. Příčina a mechanismy vzniku nových chromosomových aberací a/nebo mutací v průběhu onemocnění nejsou dosud zcela objasněny. Zda je vznik nových genetických změn ve stávajícím patologickém klonu ovlivněn i typem terapie nebo jinými specifickými faktory není zatím známo. Situaci na jedné straně komplikuje heterogenita diagnózy MDS a na straně druhé obecně malé množství nemocných v dosud publikovaných studiích (Benítez J *et al.*, 1985; Tricot G *et al.*, 1985; Horriike S *et al.*, 1988; White AD *et al.*, 1994; Tien HF *et al.*, 1995; Wang H *et al.*, 2010; Haferlach C *et al.*, 2011; da Silva-Coelho P *et al.*, 2017; Schanz J *et al.*, 2018b). Každá podobná studie proto přináší do problematiky klonálního vývoje u pacientů s MDS zásadní informace, které přispívají ke zlepšení prognostické stratifikace nemocných a k volbě nejvhodnější terapie.

## 6 ZÁVĚR

Jedním z nejdůležitějších parametrů při stanovení prognózy a často i při výběru nejvhodnější léčby u pacientů s diagnózou MDS jsou změny genomu. Zlatým standardem každého vyšetření KD u nemocných s MDS je klasická cytogenetická analýza, jejíž nálezy jsou součástí používaného prognostického systému. IPSS-R rozděluje nemocné do pěti skupin podle skóre rizika a udává pravděpodobné celkové přežití pacientů v jednotlivých skupinách. MDS je však natolik heterogenní onemocnění, že u mnoha nemocných dochází k progresi choroby i přes příznivou prognózu podle IPSS-R. Příčina zisku nových chromosomových aberací a progresse onemocnění není zatím zcela objasněna. IPSS-R zároveň nezohledňuje dynamiku onemocnění a je určen především pro stratifikaci nemocných v době diagnózy.

Předkládaná disertační práce je proto zaměřena na studium lineárního klonálního vývoje u pacientů s MDS pomocí cytogenomických metod, dále detailní identifikaci a charakterizaci změn nalezených v době diagnózy i v průběhu onemocnění a posouzení jejich prognostického významu.

Jednotlivé cíle disertační práce jsou zhodnoceny v následujících bodech:

- Lineární klonální vývoj, tedy zisk nových genomových aberací v průběhu onemocnění, byl prokázán u 8 % (36/469) MDS pacientů.
- Bylo prokázáno 57 chromosomových abnormalit v době diagnózy, z toho 32 % bylo MDS specifických. Nejpočetnější primární změnou byla del(5q) u osmi pacientů (z toho u čtyř nemocných se jednalo o jedinou změnu v karyotypu, u dvou byla nalezena v kombinaci s jednou další změnou). I přes příznivou prognózu tohoto nálezu, došlo u pěti ze šesti pacientů v průběhu klonálního vývoje k rozvoji komplexních změn karyotypu.
- V době klonálního vývoje bylo u nemocných identifikováno celkem 156 sekundárních aberací, z nichž 21 % bylo MDS specifických. Nejčastější abnormalitou získanou v průběhu onemocnění byla trisomie/tetrasomie chromosomu 8. Prognostický význam této změny při progresi onemocnění není v současné době znám.
- U 19 % nemocných s MDS a klonálním vývojem byly prokázány oblasti aUPD, ať už v době diagnózy nebo v průběhu onemocnění. V pěti případech byly prokázány oblasti specifické pro MDS (aUPD 4q, 7q, 11q, 17p). U čtyř z nich byly zároveň

potvrzeny patogenní nebo pravděpodobně patogenní homozygotní mutace genů s nimi asociovaných (*TET2*, *c-CBL*, *TP53*).

- Cytogenomické metody umožnily identifikaci celé řady kryptických změn karyotypu, které byly pod hranicí rozlišení konvenční cytogenetiky. Na základě nálezů aberací viditelných ve světelném mikroskopu a kryptických abnormalit v době diagnózy byl soubor rozdělen do čtyř skupin (normální karyotyp, jedna aberace, dvě změny a komplexní změny). Byl prokázán statisticky významný rozdíl v OS mezi těmito skupinami.
- U 18 pacientů došlo ke klonálnímu vývoji před zahájením léčby a u 13 nemocných po léčbě. Až 54 % abnormalit nalezených u pacientů s klonálním vývojem před léčbou byly nadpočetné kopie celých chromosomů, především trisomie 8 a 21. Aberace nově získané během klonálního vývoje po léčbě byly ze 44 % delece a ztráty celých chromosomů, přesto nejčtenější rekurentní změnou byla i v této skupině trisomie 8.

Tato a podobné studie dokládají, že i přes značné pokroky v cytogenomických metodách a postupech léčby v posledních desetiletích, které výrazně prodloužily OS pacientů s MDS, zůstává mnoho otázek nezodpovězeno. Heterogenita průběhu MDS stále komplikuje snahy o objasnění patogeneze onemocnění. Klonální vývoj je vícestupňový proces zisku genomových aberací, který nám alespoň z části dovoluje sledovat procesy odehrávající se v patologických buňkách.

Studium klonálního vývoje a jeho příčin je tak v současné době stále velmi aktuálním tématem. Rozšíření počtu nemocných ve studiích a detailní analýza kryptických změn může být jedním ze zásadních kroků ke stanovení prognostického významu aberací získaných v průběhu klonálního vývoje, k nalezení nových terapeutických cílů a k individualizaci léčebných postupů.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Abdel-Wahab O., Adli M., LaFave L.M., Gao J., Hricik T., Shih A.H., et al.** *ASXL1* mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*. 2012. 22:180-193.

**Akutagawa J., Huang T.Q., Epstein I., Chang T., Quiridongo-Crespo M., Cottonham C.L., et al.** Targeting the PI3K/Akt pathway in murine MDS/MPN driven by hyperactive Ras. *Leukemia*. 2016. 30:1335-1343.

**Angelova S., Spassov B., Nikolova V., Christov I., Tzvetkov N., Simeonova M.** Is amplification of c-MYC, MLL and RUNX1 genes in AML and MDS patients with trisomy 8, 11 and 21 a factor for a clonal evolution in the karyotype? *Cytol. Genet.* 2015. 49(3):165-172.

**Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al.** The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. 127:2391-2405.

**Bacher U., Haferlach T., Kern W., Haferlach C., Schnittger S.** A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007. 92:744-752.

**Bally C., Adés L., Renneville A., Sebert M., Eclache V., Preudhomme C., et al.** Prognostic value of *TP53* gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leuk. Res.* 2014. 38(7):751-755.

**Barresi V., Palumbo G.A., Musso N., Consoli C., Capizzi C., Meli C.R., et al.** Clonal selection of 11q CN-LOH and CBL gene mutation in a serially studied patient during MDS progression to AML. *Leuk. Res.* 2010. 34:1539-1542.

**Barzi A., Sekeres M.A.** Myelodysplastic syndromes: A practical approach to diagnosis and treatment. *Cleve. Clin. J. Med.* 2010. 77(1):37-44.

**Bejar R., Levine R., Ebert B.L.** Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2011a. 29(5):504-515.

**Bejar R., Stevenson K., Abdel-Wahab O., Galili N., Nilsson B., Garcia-Manero G., et al.** Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2011b. 364:2496-2506.

**Bejar R., Steensma D.P.** Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014. 124(18):2793-2803.

**Bejar R., Lord A., Stevenson K., Bar-Natan M., Pérez-Ladaga A., Zaneveld J., et al.** *TET2* mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014. 124(17):2705-2712.

**Belickova M., Vesela J., Jonasova A., Pejsova B., Votavova H., Dostalova Merkerova M., et al.** *TP53* mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016. 24(7):36266-36279.

**Benítez J., Carbonell F., Sanchez Fayos J., Heimpel H.** Karyotypic evolution in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1985. 16(2):157-167.

**Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.-T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., et al.** Proposals for the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976. 33(4):451-458.

**Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.-T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., et al.** Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1982. 51(2):189-199.

**Bennett J.M.** World health organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. *Int. J. Hematol.* 2000. 72(2):131-133.

**Bennett J.M.** A comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin. Oncol.* 2005. 32:S3-10.

**Björk J., Johansson B., Broberg K., Albin M.** Smoking as a risk factor for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia and its relation to cytogenetic findings: A case-control study. *Leuk. Res.* 2009. 33(6):788-791.

**Bernasconi P., Klersy C., Boni M., Cavigliano P.M., Giardini I., Rocca B., et al.** Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution. *Ann. Hematol.* 2010. 89(6):545-551.

**Bělohávková P.** Aktuální možnosti léčby u jednotlivých podtypů MDS. *Myelodysplastic Syndrome News*. 2016. 1:15-17.



- Bochtler T., Stölzel F., Heilig C.E., Kunz C., Mohr B., Jauch A., et al.** Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2013. 31:3898-3905.
- Bouaoun L., Sonkin D., Ardin M., Hollstein M., Byrnes G., Zavadil J., et al.** TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.* 2016. 37(9):865-76.
- Boulwood J., Pellagatti A., McKenzie A.N.J., Wainscoat J.S.** Advances in the 5q-syndrome. *Blood.* 2010. 116(26):5803-5811.
- Brezinova J., Zemanova Z., Bystricka D., Sarova I., Lizcova L., Malinova E., et al.** Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies. *Leuk. Res.* 2012. 36:e43-45.
- Brezinova J., Sarova I., Buryova H., Markova J., Ransdorfova S., Izakova S., et al.** Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zinc finger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 2014. 164(1):153-155.
- Brezinova J., Sarova I., Svobodova K., Lhotska H., Ransdorfova S., Izakova S., et al.** *ASXL1* gene alterations in patients with isolated 20q deletion. *Neoplasma.* 2019. 66(4):627-630.
- Brierley C., Steensma D.** Allogeneic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes: does pretransplant clonal burden matter? *Curr. Opin. Hematol.* 2016. 23(2):167-174.
- Brunning R.D., Orazi A., Germing U., Le Beau M.M., Porwit A., Baumann I., et al.** Myelodysplastic syndromes/neoplasms – overview. In: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. (Eds.). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, France 2008.
- Cermak J., Vitek A., Mikulenkova D., Soukupova J., Brezinova J., Stastna M., et al.** An analysis of real life data obtained from 30 years follow-up of primary myelodysplastic syndromes (MDS) patients confirms a leading role of stem cell transplantation (SCT) for achievement of prolonged survival. *Blood.* 2018. 132(S1):4372.

- Čermák J.** Posledních 25 let v diagnostice a léčbě myelodysplastického syndromu. *Transfuze Hematol. dnes.* 2019. 25(1):108-117.
- Červinek L.** Myelodysplastický syndrom. *Onkologie.* 2015. 9(3):112-118.
- da Silva-Coelho P., Kroeze L.I., Yoshida K., Koorenhof-Scheele T.N., Knops R., van de Locht L.T., et al.** Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* 2017. 8:15099.
- Damm F., Itzykson R., Kosmider O., Droin N., Renneville A., Chesnais V., et al.** *SETBP1* mutations in 658 patients with myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and secondary acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2013. 27:1401-1403.
- de Souza Fernandez T., Ornellas M.H., de Carvalho L.O., Tabak D., Abdelhay E.** Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2000. 24:839-848.
- Delhommeau F., Dupont S., Della Valle V., James C., Trannoy S., Massé A., et al.** Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 2009. 360:2289-2301.
- Della Porta M.G., Tuechler H., Malcovati L., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., et al.** Validation of WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the Revised international prognostic scoring system (IPSS-R). A study of the International working group for prognosis in myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia.* 2015. 29:1502-1513.
- DiNardo C.D., Jabbour E., Ravandi F., Takahashi K., Daver N., Routbort M., et al.** *IDH1* and *IDH2* mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia.* 2016. 30:980-984.
- Downward J.** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2003. 3:11-22.
- Dunbar A.J., Gondek L.P., O'Keefe C., Makishima H., Rataul M.S., Szpurka H., et al.** 250K SNP array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res.* 2008. 68(24):10349-10357.
- Ebert B.L.** Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin. Oncol.* 2011. 38(5):621-626.

- Ernst T., Chase A.J., Score J., Hidalgo-Curtis C.E., Bryant C., Jones A.V., *et al.*** Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat. Genet.* 2010. 42(8):722–726.
- Fenaux P., Ades L.** Review of azacitidine trials in intermediate-2- and high-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2009. 33(S2):S7-S11.
- Fenaux P., Giagounidis A., Selleslag D., Beyne-Rauzy O., Mufti G., Mittelman M., *et al.*** A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with low-/intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with *del5q*. *Blood.* 2011. 118(14):3765-3776.
- Fernandez-Mercado M., Pellagatti A., Genua C.D., Larrayoz M.J., Winkelmann N., Aranaz P., *et al.*** Mutations in *SETBP1* are recurrent in myelodysplastic syndromes and often coexist with cytogenetic markers associated with disease progression. *Br. J. Haematol.* 2013. 163(2):235-239.
- Feurstein S., Thomay K., Hofmann W., Buesche G., Kreipe H., Thol F., *et al.*** Routes of clonal evolution into complex karyotypes in myelodysplastic syndrome patients with 5q deletion. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. 19:2369.
- Fitzgibbon J., Smith L.-L., Raghavan M., Smith M.L., Debernardi S., Skoulakis S., *et al.*** Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res.* 2005. 65:9152–9154.
- Forbes S.A., Beare D., Boutselakis H., Bamford S., Bindal N., Tate J., *et al.*** COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* 2017. 45:D777-783.
- Ganguly B.B., Banerjee D., Agarwal M.B.** Impact of chromosome alterations, genetic mutations and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) on the classification and risk stratification of MDS. *Blood Cells Mol. Dis.* 2018. 69:90-100.
- Garcia-Manero G., Fenaux P., Al-Kali A., Baer M.R., Sekeres M.A., Roboz G.J., *et al.*** Rigosertib versus best supportive care for patients with high-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating drugs (ONTIME): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016. 17(4):496-508.

- Genovese G., Kähler A.K., Handsaker R.E., Lindberg J., Rose S.A., Bakhoun S.F., *et al.*** Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014. 371:2477-2487.
- Gerds A.T., Gooley T.A., Estey E.H., Appelbaum F.R., Deeg H.J., Scott B.L.** Pretransplantation therapy with azacitidine vs induction chemotherapy and posttransplantation outcome in patients with MDS. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012. 18(8):1211-1218.
- Germing U., Aul C., Niemeyer C.M., Haas R., Bennett J.M.** Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 2008. 87:691-699.
- Ghanima W., Knutsen H., Delabie J., Bruserud Ø.** Primær myelofibrose – patogeneese, diagnostikk og behandling. *Tidsskr Nor Legeforen.* 2013. 133(18): 1946–50.
- Giagounidis A., Haase D.** Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 2013. 26:337-353.
- Göhring G., Lange K., Hofmann W., Nielsen K.V., Hellström-Lindberg E., Roy L., *et al.*** Telomere shortening, clonal evolution and disease progression in myelodysplastic syndrome patients with 5q deletion treated with lenalidomide. *Leukemia.* 2012. 26:356-358.
- Grand F.H., Hidalgo-Curtis C.E., Ernst T., Zoi K., Zoi C., McGuire C., *et al.*** Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009. 113(24):6182-6192.
- Greenberg P., Cox C., Le Beau M.M., Fenaux P., Morel P., Sanz G., *et al.*** International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997. 89(6):2079-2088.
- Greenberg P.L., Attar E., Bennett J.M., Bloomfield C.D., De Castro C.M., Deeg H.J., *et al.*** Myelodysplastic syndromes: Clinical practice guidelines in oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2011. 9(1):30-56.
- Greenberg P.L., Tuechler H., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Solé F., *et al.*** Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 2012. 120(12):2454-2465.

- Gronseth C.M., McElhone S.E., Storer B.E., Kroeger K.A., Sandhu V., Fero M.L., *et al.*** Prognostic significance of acquired copy-neutral loss of heterozygosity in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2015. 121:2900-2908.
- Grove C.S., Vassiliou G.S.** Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis. Model. Mech.* 2014. 7:941-951.
- Haase D., Germing U., Schanz J., Pfeilstöcker M., Nösslinger T., Hildebrandt B., *et al.*** New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007. 110(13):4385-4395.
- Haase D.** Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 2008. 87:512-526.
- Haddad A., Maciejewski J.P., Kalaycio M.** Clinical significance of cytogenetics in myelodysplastic syndromes. *Labmedicine*. 2008. 39(6):367-370.
- Haferlach C., Zenger M., Alpermann T., Schnittger S., Kern W., Haferlach T.** Cytogenetic clonal evolution in MDS is associated with shifts towards unfavourable karyotypes according to IPSS and shorter overall survival: a study on 988 MDS patients studied sequentially by chromosome banding analysis. *Blood*. 2011. 21:968.
- Haferlach T., Nagata Y., Grossman V., Okuno Y., Bacher U., Nagae G., *et al.*** Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014. 28:241-247.
- Hasle H., Niemeyer C.M., Chessells J.M., Baumann I., Bennett J.M., Kerndrup G., *et al.*** A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003. 17:277-282.
- Hellström-Lindberg E., Gulbrandsen N., Lindberg G., Ahlgren T., Dahl I.M.S., Dybedal I., *et al.*** A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects of quality of life. *Br. J. Haematol.* 2003. 120:1037-1046.
- Horiike S., Taniwaki M., Misawa S., Abe T.** Chromosome abnormalities and karyotypic evolution in 83 patients with myelodysplastic syndrome and predictive value for prognosis. *Cancer*. 1988. 62(6):1129-1138.

**ISCN 2016:** An International System for Human Cytogenomic Nomenclature, in: J. McGowan-Jordan, A. Simons, M. Schmid (Eds.), Cytogenet. Genome Res. 2016. 149:1-140.

**Issa J.P., Roboz P., Rizzieri D., Jabbour E., Stock W., O'Connell C., *et al.*** Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2015. 16(9):1099-1110.

**Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y.** Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* 2010. 466:1129-1133.

**Itzykson R., Kosmider O., Cluzeau T., Mansat-De Mas V., Dreyfus F., Beyne-Rauzy O., *et al.*** Impact of *TET2* mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2011. 25:1147-1152.

**Jabbour E., Takahashi K., Wang X., Cornelison A.M., Abruzzo L., Kadia T., *et al.*** Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* 2013. 88(10):831-837.

**Jaiswal S., Fontanillas P., Flannick J., Manning A., Grauman P.V., Brenton B.A., *et al.*** Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Eng. J. Med.* 2014. 371:2488-2498.

**Jankowska A.M., Szpurka H., Tiu R.V., Makishima H., Afable M., Huh J., *et al.*** Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009. 113(25):6403–6410.

**Jasek M., Gondek L.P., Bejanyan N., Tiu R., Huh J., Theil K.S., *et al.*** TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia.* 2010. 24(1):216–219.

**Jädersten M., Saft L., Smith A., Kulasekararaj A., Pomplun S., Göhring G., *et al.*** TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J. Clin. Oncol.* 2011. 29(15):1971-1979.

**Jerez A., Gondek L.P., Jankowska A.M., Makishima H., Przychodzen B., Tiu R.V., *et al.*** Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J. Clin. Oncol.* 2012a. 30(12):1343-1349.

**Jerez A., Sugimoto Y., Makishima H., Verma A., Jankowska A.M., Przychodzen B., *et al.*** Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical association and genomic pathogenesis. *Blood.* 2012b. 119(25):6109-6117.

**Johansson B., Billström R., Broberg K., Fioretos T., Nilsson P.-G., Ahlgren T., *et al.*** Cytogenetic polyclonality in hematologic malignancies. *Gene Chromosomes Cancer.* 1999. 24(3):222-229.

**Jonasova A., Neuwirtova R., Polackova H., Siskova M., Stopka T., Cmunt E., *et al.*** Lenalidomide treatment in lower risk myelodysplastic syndromes – The experience of a Czech hematology center. *Leuk. Res.* 2018. 69:12-17.

**Jonášová A., Čermák J., Červínek L., Nováková L., Bělohávková P., Vondráková J., *et al.*** První zkušenosti České MDS skupiny s terapií 5-azacytidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední 2 a vysoké riziko), akutní myeloidní leukemií do 30 % myeloblastů a chronickou myelomonocytární leukemií II. *Transfuze Hematol. dnes.* 2013. 19(3):125-133.

**Jonášová A.** Současné možnosti a perspektivy v terapii myelodysplastického syndromu. *Transfuze Hematol. dnes.* 2018. S2:85-87.

**Kameoka J., Funato T., Obara Y., Kadowaki I., Yokoyama H., Kimura T., *et al.*** Clonal evolution from trisomy into tetrasomy of chromosome 8 associated with the development of acute myeloid leukemia from myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2001. 124(2):159-164.

**Killick S.B., Carter C., Culligan D., Dalley C., Das-Gupta E., Drummond M., *et al.*** Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *Brit. J. Haematol.* 2014. 164:503-525.

**Koreth J., Pidala J., Perez V.S., Deeg H.J., Garcia-Manero G., Malcovati L., *et al.*** Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in older patients with de novo myelodysplastic syndromes: an international collaborative decision analysis. *J. Clin. Oncol.* 2013. 31(21):2662-2670.

- Kralovics R., Guan Y., Prchal J.T.** Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2002. 30:229–236.
- Kralovics R., Buser A.S., Teo S.-S., Coers J., Tichelli A., van der Maas A.P.C., *et al.*** Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2003. 102(5):1869–1871.
- Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.-S., Tiedt R., Passweg J.R., *et al.*** A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2005. 352:1779–1790.
- Lai J.L., Preudhomme C., Zandecki M., Flactif M., Vanrumbeke M., Lepelley P., *et al.*** Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia.* 1995. 9(3):370-381.
- Landrum M., Lee J.M., Benson M., Brown G.R., Chao C., Chitipiralla S., *et al.*** ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018. 46:D1062-1067.
- Langemeijer S.M.C., Kuiper R.P., Berends M., Knops R., Aslanyan M.G., Massop M., *et al.*** Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2009. 41(7):838–842.
- Le Beau M.M., Albain K.S., Larson R.A., Vardiman J.W., Davis E.M., Blough R.R., *et al.*** Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J. Clin. Oncol.* 1986. 4(3):325-345.
- Lin C., Hou H., Chou W., Kuo Y., Liu C., Chen C., *et al.*** *IDH* mutations are closely associated with mutations of *DNMT3A*, *ASXL1* and *SRSF2* in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution. *Am. J. Hematol.* 2014. 89(2):137-144.
- Link D.C., Walter M.J.** 'CHIP'ping away at clonal hematopoiesis. *Leukemia.* 2016. 30:1633-1635.



- List A., Dewald G., Bennett J., Giagounidis A., Raza A., Feldman E., et al.** Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N. Engl. J. Med.* 2006. 355:1456-1465.
- Ma X., Does M., Raza A., Mayne S.T.** Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer.* 2007. 109:1536-1542.
- Makishima H., Maciejewski J.P.** Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2011. 17:3913-3923.
- Makishima H., Yoshida K., Nguyen N., Przychodzen B., Sanada M., Okuno Y., et al.** Somatic *SETBP1* mutations in myeloid malignancies. *Nature Genet.* 2013. 45:942-946.
- Makishima H., Yoshizato T., Yoshida K., Sekeres M.A., Radivoyevitch T., Suzuki H., et al.** Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Genet.* 2017. 49:204-212.
- Malcovati L., Papaemmanuil E., Bowen D.T., Boulwood J., Della Porta M.G., Pascutto C., et al.** Clinical significance of *SF3B1* mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011. 118:6239-6246.
- Malcovati L., Karimi M., Papaemmanuil E., Ambaglio I., Jäderstein M., Jansson M., et al.** *SF3B1* mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood.* 2015. 126(2):233-241.
- Maserati E., Aprili F., Vinante F., Locatelli F., Amendola G., Zatterale A., et al.** Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20% of cases. *Gene Chromosomes Cancer.* 2002. 33:93-97.
- Nazha A., Narkhede M.S., Radivoyevitch T., Kalaycio M., Patel B.J., Gerds A.T., et al.** The Revised International Prognostic Scoring System “Molecular” (IPSS-Rm), a validated and dynamic model in treated patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood.* 2015a. 126(23):607.
- Nazha A., Seastone D.P., Keng M., Hobson S., Kalaycio M., Maciejewski J.P., et al.** The Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) is not predictive of survival in patients with secondary myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma.* 2015b. 56(12):3437-3439.

**Neukirchen J., Lauseker M., Hildebrandt B., Nolting A.-C., Kaivers J., Kobbe G., *et al.*** Cytogenetic clonal evolution in myelodysplastic syndromes is associated with inferior prognosis. *Cancer*. 2017. 123(23):4608-4616.

**Neuwirtová R., Jonášová A., Čermák J., Vondráková J., Šišková M., Hochová I., *et al.*** Analýza nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS) s delecí dlouhého ramene 5. chromozomu del(5q), sledovaných Českou MDS pracovní skupinou. Význam pro diagnostické zařazení a určení prognózy. *Transfuze Hematol. dnes*. 2009. 15(4):204-209.

**Neuwirtová R., Zemanová Z., Březinová J., Belíčková M., Dvořák P., Oltová A., *et al.*** Jsme oprávněni řadit nemocné s dvěma samostatnými buněčnými klony a to s delecí 5q a s trizomií 8 jako podskupinu myelodysplastického syndromu typu 5q- syndromu? *Transfuze Hematol. dnes*. 2014. 20(1):25-31.

**Nielsen J., Wohler M.** Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum. Genet.* 1991. 87:81-83.

**Nimer S.D.** Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008. 111(10):4841-4851.

**O'Keefe C., McDevitt M.A., Maciejewski J.P.** Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 2010. 115(14):2731-2739.

**Papaemmanuil E., Cazzola M., Boulton J., Malcovati L., Vyas P., Bowen D., *et al.*** Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* 2011. 365:1384-1395.

**Papaemmanuil E., Gerstung M., Malcovati L., Tauro S., Gundem G., Van Loo P., *et al.*** Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013. 122(22):3616-3627.

**Paulsson K., Johansson B.** Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol. Biol.* 2007. 55:37-48.

**Preudhomme C., Vanrumbeke M., Lai J.L., Lepelletier P., Wattel E., Fenaux P.** Inactivation of the p53 gene in leukemias and myelodysplastic syndrome (MDS) with 17p monosomy. *Leukemia*. 1994. 8(12):2241-2242.

- Raghavan M., Lillington D.M., Skoulakis S., Debernardi S., Chaplin T., Foot N.J., *et al.*** Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res.* 2005. 65:375-378.
- Raghavan M., Smith L.-L., Lillington D.M., Chaplin T., Kakkas I., Molloy G., *et al.*** Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. *Neoplasia.* 2008. 112(3):814-821.
- Raza A., Galili N.** The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat. Rev. Cancer.* 2012. 12:849-859.
- Rollison D.E., Howlader N., Smith M.T., Strom S.S., Merritt W.D., Ries L.A., *et al.*** Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood.* 2008. 112:45-52.
- Rücker F.G., Bullinger L., Schwaenen C., Lipka D.B., Wessendorf S., Fröhling S., *et al.*** Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J. Clin. Oncol.* 2006. 24:3887-3894.
- Sakurai H., Harada Y., Ogata Y., Kagiya Y., Shingai N., Doki N., *et al.*** Overexpression of *RUNX1* short isoform has an important role in the development of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv.* 2017. 18:1382-1386.
- Sandhu S.K., Sekeres M.A.** Myelodysplastic syndromes: more prevalent than we know. *Geriatrics.* 2008. 63:10-17.
- Sarova I., Brezinova J., Zemanova Z., Bystricka D., Krejcik Z., Soukup P., *et al.*** Characterization of chromosome 11 breakpoints and the areas of deletion and amplification in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Gene Chromosomes Cancer.* 2013. 52:619-635.
- Saumell S., Florensa L., Luño E., Sanzo C., Cañizo C., Hernández J.M., *et al.*** Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 2012. 159:311-321.

- Saumell S., Solé F., Arenillas L., Montoro J., Valcárcel D., Pedro C., *et al.*** Trisomy 8, a cytogenetic abnormality in myelodysplastic syndromes, is constitutional or not? *PloS One*. 2015. 10(6):0129375.
- Seghezzi L., Maserati E., Minelli A., Dellavecchia C., Abdis P., Locatelli F., *et al.*** Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Gene Chromosomes Cancer*. 1996. 17:94-101.
- Sekeres M.A., Cosgrove D., Falco A.** Managing patients with low-risk MDS. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2006. 4(7 suppl 16):1-10.
- Shallis R.M., Ahmad R., Zeidan A.M.** The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur. J. Haematol.* 2018. 101:260-271.
- Schanz J., Steidl C., Fonatsch C., Pfeilstöcker M., Nösslinger T., Tuechler H., *et al.*** Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the International prognostic scoring system. *J. Clin. Oncol.* 2011. 29(15):1963-1970.
- Schanz J., Tüchler H., Solé F., Mallo M., Luño E., Cervera J., *et al.*** New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J. Clin. Oncol.* 2012. 30:820-829.
- Schanz J., Solé F., Mallo M., Luño E., Cervera J., Granada I., *et al.*** Clonal architecture in patients with myelodysplastic syndromes and double or minor complex abnormalities: detailed analysis of clonal composition, involved abnormalities, and prognostic significance. *Gene Chromosomes Cancer*. 2018a. 57:547-556.
- Schanz J., Cevik N., Fonatsch C., Bräulke F., Shimeshan K., Bacher U., *et al.*** Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood Cancer J.* 2018b. 8:28.
- Soenen V., Preudhomme C., Roumier C., Daudignon A., Lai J.L., Fenaux P.** 17p deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood*. 1998. 91(3):1008-1015.

- Solé F., Espinet B., Sanz G.F., Cervera J., Calasanz M.J., Luño E., *et al.*** Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 2000. 108:346-356.
- Solé F., Luño E., Sanzo C., Espinet B., Sanz G.F., Cervera J., *et al.*** Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2005. 90:1168-1178.
- Steensma D.P., Bennett J.M.** The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc.* 2006. 81:104-130.
- Steensma D.P., Gattermann N.** When is iron overload deleterious, and when and how should iron chelation therapy be administered in myelodysplastic syndromes? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2013. 26:431-444.
- Steensma D.P., Bejar R., Jaiswal S., Lindsley R.C., Sekeres M.A., Hasserjian R.P. *et al.*** Clonal hematopoiesis of intermediate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015. 126(1):9-16.
- Steensma D.P.** Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018. 8(5):47.
- Strom S.S., Gu Y., Gruschkus S.K., Pierce S.A., Estey E.H.** Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia.* 2005. 19:1912-1918.
- Suciu S., Kuse R., Weh H.J., Hossfeld D.K.** Results of chromosome studies and their relation to morphology, course, and prognosis in 120 patients with de novo myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1990. 44(1):15-26.
- Svobodova K., Zemanova Z., Lhotska H., Novakova M., Podskalska L., Belickova M., *et al.*** Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2016. 42:7-12.
- Szpurka H., Gondek L.P., Mohan S.R., Hsi E.D., Theil K.S., Maciejewski J.P.** UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation. *Leukemia.* 2009. 23:610–614.
- Šárová I., Březinová J., Zemanová Z., Izáková S., Lizcová L., Malinová E., *et al.*** Cytogenetic manifestation of chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010.199:121-127.

**Šindelářová L., Michalová K., Zemanová Z., Ransdorfová Š., Březinová J., Peková S., *et al.*** Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2005. 160:27-34.

**Tien H.-F., Wang C.-H., Chuang S.-M., Lee F.-Y., Liu M.-C., Chen Y.-C., *et al.*** Acute leukemic transformation of myelodysplastic syndrome – immunophenotypic, genotypic, and cytogenetic studies. *Leuk. Res.* 1995. 19(9):595-603.

**Tricot G., Boogaerts M.A., De Wolf-Peeters C., Van den Berghe H., Verwilghen R.L.** The myelodysplastic syndromes: different evolution patterns based on sequential morphological and cytogenetic investigations. *Br. J. Haematol.* 1985. 59(4):659-670.

**Tuna M., Knuutila S., Mills G.B.** Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol. Med.* 2009. 15(3):120-128.

**UKCCG (United Kingdom Cancer Cytogenetics Group).** Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic and bone marrows. *Gene Chromosomes Cancer.* 1992. 5:83-88.

**Valent P., Horny H.-P., Bennett J.M., Fonatsch C., Germing U., Greenberg P., *et al.*** Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk. Res.* 2007. 31:727-736.

**Valent P., Horny H.P.** Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009. 39(7):548-553.

**Valent P., Jäger E., Mitterbauer-Hohendanner G., Müllauer L., Schwarzingner I., Sperr W.R., *et al.*** Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *Am. J. Cancer Res.* 2011. 1(4):531-541.

**Valent P., Bain B.J., Bennett J.M., Wimazal F., Sperr W.R., Mufti G., *et al.*** Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk. Res.* 2012. 36(1):1-5.

- Wang H., Wang X.-Q., Xu X.-P., Lin G.-W.** Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010. 196(2):159-166.
- Weinberg O.K., Hasserjian R.P.** The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Semin. Hematol.* 2019. 56:15-21.
- Welch J.S., Ley T.J., Link D.C., Miller C.A., Larson D.E., Koboldt D.C., *et al.*** The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012. 150(2):264-278.
- Welch J.S., Petti A.A., Miller C.A., Fronick C.C., O’Laughlin M., Fulton R.S., *et al.*** *TP53* and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2016. 375:2023-2036.
- White A.D., Hoy T.G., Jacobs A.** Extended cytogenetic follow-up and clinical progress in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk. Lymphoma.* 1994. 12:401-412.
- White N.J., Nacheva E., Asimakopoulos F.A., Bloxham D., Paul B., Green A.R.** Deletion of chromosome 20q in myelodysplasia can occur in a multipotent precursor of both myeloid cells and B cells. *Blood.* 1994. 83(10):2809-2816.
- Wiktor A., Rybicki B.A., Piao Z.S., Shurafa M., Barthel B., Maeda K., *et al.*** Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Gene Chromosomes Cancer.* 2000. 27:11-16.
- Wiktor A.E., Van Dyke D.L., Hodnefield J.M., Eckel-Passow J., Hanson C.A.** The significance of isolated Y chromosome loss in bone marrow metaphase cells from males over age 50 years. *Leuk. Res.* 2011. 35:1297-1300.
- Wlodarski M.W., Sahoo S.S., Niemeyer C.M.** Monosomy 7 in pediatric myelodysplastic syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2018. 32:729-743.
- Wong A.K., Fang B., Zang L., Guo X., Lee S., Schreck R.** Loss of the Y chromosome. An age related of clonal phenomenon in acute myelogenous leukemia/myelodysplastic syndrome? *Arch. Patol. Lab. Med.* 2008. 132:1329-1332.
- Wu C., Pan J., Qiu H., Xue Y., Chen S., Wu Y., *et al.*** Microarray CGH analysis of hematological patients with del(20q). *Int. J. Hematol.* 2015. 102:617-625.

**Yoshida K., Sanada M., Shiraishi Y., Nowak D., Nagata Y., Yamamoto R., *et al.*** Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011. 478:64-69.

**Zemanova Z., Michalova K., Buryova H., Brezinova J., Kostylkova K., Bystricka D., *et al.*** Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk. Res*. 2014. 38:537-544.

**Zwierzina H., Suciu S., Loeffler-Ragg J., Neuwirthova R., Fenaux P., Beksac M., *et al.*** Low-dose cytosine arabinoside (LD-AraC) vs LD-AraC plus granulocyte/macrophage colony stimulating factor vs LD-AraC plus Interleukin-3 for myelodysplastic syndrome patients with a high risk of developing acute leukemia: final results of a randomized phase III study (06903) of the EORTC Leukemia Cooperative Group. *Leukemia*. 2005. 19:1929-1933.



## 8 SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha č. 1:** Detailní charakteristika 36 pacientů s MDS a lineárním klonálním vývojem s rozdělením do skupin 1-4 podle cytogenomického nálezu v době diagnózy.

**Příloha č. 2:** Svobodova K., Lhotska H., Hodanova L., Pavlistova L., Vesela D., Belickova M., Vesela J., Brezinova J., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Siskova M., Jonasova A., Cermak J., Michalova K., Zemanova Z.: Cryptic aberrations may allow more accurate prognostic classification of patients with myelodysplastic syndromes and clonal evolution. *Gene Chromosomes Cancer*. 2020, 59:396-405. (podíl autora 50 %)

**Příloha č. 3:** Brezinova J., Sarova I., Svobodova K., Lhotska H., Ransdorfova S., Izakova S., Pavlistova L., Lizcova L., Skipalova K., Hodanova L., Markova J., Zemanova Z., Cermak J., Jonasova A., Michalova K.: *ASXL1* gene alterations in patients with isolated 20q deletion. *Neoplasma*. 2019, 66(4):627-630. (podíl autora 15 %)

**Příloha č. 4:** Svobodova K., Zemanova Z., Lhotska H., Novakova M., Podskalska L., Belickova M., Brezinova J., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Berkova A., Siskova M., Jonasova A., Cermak J., Michalova K.: Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of *TP53* are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res*. 2016, 42:7-12. (podíl autora 50 %)

**Příloha č. 5:** Svobodová K., Zemanová Z., Lhotská H., Nováková M., Březinová J., Belíčková M., Berková A., Šárová I., Lizcová L., Izáková S., Jonášová A., Čermák J., Michalová K.: Získaná uniparentální disomie v buňkách kostní dřeně nemocných s myelodysplastickými syndromy a komplexním karyotypem. *Transfuze Hematol. dnes*. 2015, 3:126–134. (podíl autora 50 %)

**Příloha č. 6:** Zemanova Z., Michalova K., Buryova H., Brezinova J., **Kostylkova K.**, Bystricka D., Novakova M., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Ransdorfova S., Krejcik Z., Dostalova Merkerova M., Dohnalova A., Siskova M., Jonasova A., Neuwirtova R., Cermak J. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. Leuk. Res. 2014, 38:537-544. (podíl autora 10 %)

**Příloha č. 7:** Brezinova J., Sarova I., Buryova H., Markova J., Ransdorfova S., Izakova S., **Kostylkova K.**, Soukupova J., Zemanova Z., Michalova K.: Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zincfinger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. Br. J. Haematol. 2014, 164:142–159. (podíl autora 10 %)

## 9 SEZNAM PUBLIKACÍ

### Publikace související s tématem disertační práce

**Svobodova K.,** Lhotska H., Hodanova L., Pavlistova L., Vesela D., Belickova M., Vesela J., Brezinova J., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Siskova M., Jonasova A., Cermak J., Michalova K., Zemanova Z.: Cryptic aberrations may allow more accurate prognostic classification of patients with myelodysplastic syndromes and clonal evolution. *Gene Chromosomes Cancer*. 2020, 59:396-405. IF18 2.940

Brezinova J., Sarova I., **Svobodova K.,** Lhotska H., Ransdorfova S., Izakova S., Pavlistova L., Lizcova L., Skipalova K., Hodanova L., Markova J., Zemanova Z., Cermak J., Jonasova A., Michalova K.: *ASXL1* gene alterations in patients with isolated 20q deletion. *Neoplasma*. 2019, 66(4):627-630. IF18 1.771

**Svobodova K.,** Zemanova Z., Lhotska H., Novakova M., Podskalska L., Belickova M., Brezinova J., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Berkova A., Siskova M., Jonasova A., Cermak J., Michalova K.: Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of *TP53* are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res*. 2016, 42:7-12. IF16 2.606

**Svobodová K.,** Zemanová Z., Lhotská H., Nováková M., Březinová J., Belíčková M., Berková A., Šárová I., Lizcová L., Izáková S., Jonášová A., Čermák J., Michalová K.: Získaná uniparentální disomie v buňkách kostní dřeně nemocných s myelodysplastickými syndromy a komplexním karyotypem. *Transfuze Hematol. dnes*. 2015, 3:126–134. IF 0

*Cena časopisu Transfuze a hematologie dnes za nejlepší odborné sdělení v oboru hematologie v roce 2015*

Zemanova Z., Michalova K., Buryova H., Brezinova J., **Kostylkova K.**, Bystricka D., Novakova M., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Ransdorfova S., Krejcik Z., Dostalova Merkerova M., Dohnalova A., Siskova M., Jonasova A., Neuwirtova R., Cermak J.: Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk. Res.* 2014, 38:537-544. IF14 2.351

Brezinova J., Sarova I., Buryova H., Markova J., Ransdorfova S., Izakova S., **Kostylkova K.**, Soukupova J., Zemanova Z., Michalova K.: Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zincfinger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 2014, 164:142–159. IF14 4.971

### **Ostatní publikace**

Prukova D., Andera L., Nahacka Z., Karolova J., Svaton M., Klanova M., Havranek O., Soukup J., **Svobodova K.**, Zemanova Z., Tuskova D., Pokorna E., Helman K., Forsterova K., Pacheco-Blanco M., Vockova P., Berkova A., Fronkova E., Trneny M., Klener P.: Co-targeting of BCL2 with venetoclax and MCL1 with S63845 is synthetically lethal *in vivo* in relapsed mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2019, 25:4455-4465. IF18 8.911

Sarova I., Brezinova J., Zemanova Z., Ransdorfova S., **Svobodova K.**, Izakova S., Pavlistova L., Lizcova L., Berkova A., Skipalova K., Hodanova L., Salek C., Jonasova A., Michalova K.: High frequency of dicentric chromosomes detected by multi-centromeric FISH in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype. *Leuk. Res.* 2018, 68:85-89. IF18 2.066

Sarova I., Brezinova J., Zemanova Z., Ransdorfova S., Izakova S., **Svobodova K.**, Pavlistova L., Berkova A., Cermak J., Jonasova A., Siskova M., Michalova K.: Molecular cytogenetic analysis of dicentric chromosomes in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2016, 43:51-57. IF16 2.606

*Lhotska H., Zemanova Z., Cechova H., Ransdorfova S., **Svobodova K.**, Kramar F., Krejcik Z., Michalova K.:* Primary and recurrent diffuse astrocytomas: genomic profile comparison reveals acquisition of biologically relevant aberrations. *Mol. Cytogenet.* 2016, 9:13. IF16 1.506

*Lhotska H., Zemanova Z., Cechova H., Ransdorfova S., Lizcova L., Kramar F., Krejcik Z., **Svobodova K.**, Bystricka D., Hrabal P., Dohnalova A., Michalova K.:* Genetic and Epigenetic Characterization of Low-Grade Gliomas Reveals Frequent Methylation of the MLH3 Gene. *Gene Chromosomes Cancer.* 2015, 54:655-667. IF15 3.96

*Lhotská H., Zemanová Z., Kramář F., Lizcová L., **Svobodová K.**, Ransdorfová Š., Bystřická D., Krejčík Z., Hrabal P., Dohnalová A., Kaiser M., Michalová K.:* Molekulárně cytogenetická analýza chromozomových aberací v buňkách nízkostupňových gliomů a její přínos pro klasifikaci nádoru. *Klin. Onkol.* 2014, 27(3):183-191. IF 0

### **Příloha č. 1**

Detailní charakteristika 36 pacientů s MDS a lineárním klonálním vývojem s rozdělením do skupin 1-4 podle cytogenomického nálezu v době diagnózy.

ID = identifikační číslo pacienta; NA = nebylo analyzováno; NA\* = nebylo analyzováno pro nedostatek archivovaného materiálu  
Tučným písmem jsou zvýrazněny změny získané v průběhu klonálního vývoje.

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
Skupina 1 – normální karyotyp				
1	5/14	46,XX[13]	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2 ,(PTPRT,MYBL2)x2,(D7Z1,D7S486)x2, (D8Z2,NA)x2,(PMP22,RP11-353O18)x2[200]	NA
	4/15	46,XX[17]	<b>nuc</b> <b>ish(D8Z2x3,NAx2)[80/200],(PMP22x3,RP11-353O18x2) [14/200]</b>	<b>arr[GRCh37] (8)x3,17p12(14111802_15497854)x3</b>
2	12/14	46,XY[24]	nuc ish(D8Z2,NA)x2	NA
	1/16	<b>47,XY,+8[4]/46,XY[20]</b>	<b>nuc ish(D8Z2x3,NAx2)[18/200]</b>	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
3	1/11	46,XY[22]	nuc ish(D5S23/D5S721,EGR1)x2, (D7Z1,D7S486)x2[200]	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
	1/12	<b>42,XY,del(5)(q14q34),-7,del(13)(q12q33),-16,der(18)t(18;20)(q11.2;q?),-20,dic(13;21)(p11.1;p11.1),del(22)(q11.1)[16]/46,XY[5]</b>	<b>nuc ish(D5S23/D5S721x2,EGR1x1)[42/200], (D7Z1x2,D7S486x1) [44/200]</b>	<b>arr[GRCh37] 5q15q22.1(95961048_111091523)x1,5q22.3q35.2(114895418_174007263)x1,(7)x1,13q11q12.3(19030210_29623245)x3,13q12.3q32.3(29647487_101286596)x1,(16)x1,18p11.31pter(14346_7023386)x1,20q11.23q13.31(35238764_55687009)x1,22q11.22q13.33(22850024_50876041)x1</b>
4	8/08	46,XY[16]	nuc ish(D7Z1,D7S486)x2,(D8Z2,NA)x2	NA*
	9/11	<b>47,XY,+8[20]/46,XY[2]</b>	<b>nuc ish(D8Z2x3,NAx2)[171/200]</b>	<b>arr[GRCh37] 5p15.1p14.3(15016627_22036251)x2 hmz,7q11.22qter(67996983_159100528)x2 hmz,(8)x3</b>
5	9/11	46,XX[22]	nuc ish(MEGF6/TP73,ANGPTL1/ABL2)x2[200]	NA*
	11/16	<b>46,XX,der(18)t(1;18)(q21;q23)[2]/46,XX[20]</b>	<b>nuc</b> <b>ish(MEGF6/TP73x2,ANGPTL1/ABL2x3) [48/200]</b>	NA*

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
6	1/15	46,XX[22]	nuc ish(RP11-157H12,RP11-47F19)x2[200]	NA
	4/15	46,XX,del(14)(q31q32.3)[20]/46,XX[2]	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(D8Z2,NA)x2,(MLLx2)[200], (RP11-157H12,RP11-47F19)x1[152/200]	arr[GRCh37] 14q23.1q32.2(61822465_98550996)x1
7	4/11	46,XX[22]	nuc ish(NA,D12Z3)x2[200]	NA
	10/13	47,XX,+12[8]/46,XX[14]	nuc ish(D8Z2x2,D12Z3x3)[68/200]	arr(12)x3
8	7/10	46,XX[18]	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(MLLx2),(D8Z2,NA)x2,(RB1,D13S327)x2[200]	NA*
	8/11	47,XX,+13[15]/46,XX[5]	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(MLLx2),(D3Z1,D8Z2)x2,(D21S259/D21S341/D21S342,D16Z3)x2[200]	NA*
9	3/10	46,XY[22]	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(MLLx2),(D8Z2,NA)x2	NA
	4/14	44~50,XY,+8,+14,+19,+21[cp12]	nuc ish(D21S259/D21S341/D21S342,D8Z2)x3[168/200]	arr(8)x3,(14)x3,(19)x3,(21)x3
10	12/15	Neinformativní	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2,(PTPRT,MYBL2)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(D8Z2,NA)x2[200]	NA
	3/16	45,XY,-7[12]/46,XY[11]	nuc ish(D7Z1x2,D7S486x1)[126/200]	arr(7)x1



ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
11	1/07	46,XX[22]	nuc ish(D5S1518E/5S1976,CDC25C/EGR1)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(D8Z2,NA)x2[200]	NA*
	5/08	<b>47,XX,+8[4]/46,XX[11]</b>	<b>nuc ish(D8Z2x3,NAx2)[8/300]</b>	NA*
12	2/12	46,XY[20]	nuc ish(D8Z2,NA)x2[200]	NA
	6/13	<b>47,XY,+8[2]/46,XY[20]</b>	<b>nuc ish(D8Z2x3,NAx2)[6/200]</b>	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
<b>Skupina 2 – jedna aberace</b>				
13	10/12	Neinformativní	nuc ish(hTERT,CDC25C/EGR1,CSF1R/RPS14)x2,(MAPRE1,PTPRT)x2[200],(D7Z1,D7S486)x1[33/200],(D8Z2,NA)x2[200]	NA
	8/14	Neinformativní	nuc ish (D7Z1,D7S486)x1[24/200],( <b>D5S1518E/D5S1976x2,CDC25C/EGR1x1,RPS14x1</b> )[32/200]	Neinformativní
14	8/15	Neinformativní	nuc ish(D5S1518E/D5S1976,CDC25C/EGR1,RPS14)x2,(PTPRT,MYBL2)x2,(D7Z1,D7S486)x2[200],(D8Z2x3,NAx2)[10/200]	NA
	10/15	46,XX[18]	<b>nuc ish(D8Z2x3~4,NAx2)[10/200]</b>	NA*
15	10/08	46,XY[22]	nuc ish(D7Z1x1,D21S259/D21S341/D21S342x2)[84/200]	NA
	5/10	<b>44~47,XY,-7,+21,+22[cp22]</b>	<b>nuc ish(D7Z1x1,D21S259/D21S341/D21S342x3)[174/200]</b>	<b>arr(7)x1,(21)x3,(22)x3</b>

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
16	7/08	46,XX[22]	nuc ish(D5S23/D5S721,EGR1)x2,(D7Z1,D7S486)x2,(D8Z2,NA)x2,(RB1,D13S327)x2,(TP53,D18Z1)x2[200],(RP5-1059M17x1,D7Z1x2)[166/200]	NA
	1/12	<b>46,X,t(X;13)(p21;q13)[2]/46,XX[17]</b>	nuc ish(RP5-1059M17x1,D7Z1x2)[156/200], <b>(RB1x1,D13S327x2)[26/200]</b>	arr[GRCh37] 7q22.1(100998762_101931835)x1, <b>13q13.3q14.3(39062906_53424269)x1</b>
17	6/13	46,XY,del(20)(q11q12)[10]/46,XX[1]	nuc ish(MAPRE1,PTPRT)x1[168/200]	arr[GRCh37] 20q11.21q13.31(31330130_56303239)x1
	3/16	<b>90~95,XXYY,-7,+10,+13,+13,-16,-18,del(20)(q11q12)x2[cp22]</b>	nuc ish(MLLx4)[161/200]/(MLLx3)[5/200],(MAPRE1,PTPRT)x3[18/200]/(MAPRE1,PTPRT)x1[9/200]	arr[GRCh37] <b>(7)x1,(10)x3,(13)x4,(16)x1,(18)x1</b> ,20q11.21q13.31(31373459_56267995)x1
18	1/14	46,XX,del(5)(q13.3q33.3)[5]/46,XX[17]	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[103/200],(MLLx2)[200]	NA
	12/15	<b>43~45,XX,del(3)(?p11),del(5)(q13.3q33.3),?hsr(11)(q?),der(12)t(3;12)(?;q14),t(12;15)(q24.1;q15),dic(17;18)(p11.1;q11.1)[cp22]</b>	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[172/200],(MLLamp)[161/200],(TP53x1,D17Z1x2)[172/200]	arr[GRCh37] <b>3q11.1q25.2(93527705_153892761)x1,3q25.33q26.1(160025517_162396509)x1,3q26.1(162704921_163643821)x1,5q14.3q33.3(86672730_156264063)x1,11q23.3qter(117972993_134945136)x3,12pterp13.31(163618_6574081)x1,12p13.2p13.1(10124283_12890207)x1,12q14.1q22(58299_116_95311193)x1,12q23.1(96451849_101400124)x1,12q24.31(1208561_85_122884511)x1,12q24.32q24.33(129068830_130551325)x1,15q13.2q14(30390043_34695196)x1,15q15.1(40736278_41847178)x1,15q15.1q15.3(42349650_43705453)x1,15q15.3(43782831_43951274)x1,17pterp11.2(59767_16603160)x1,18q12.2q12.3(35114616_37880114)x1,18q21.1q21.1(46214408_46767907)x1</b>

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
19	4/10	46,XX[22]	nuc ish(EGR1,D5S23,D5S721)x2,(TP53,D17Z1)x2,(MLLx2),(RP11-83L6,NA)x2[200]	arr[GRCh37] 4q21.21qter(78967598_190449761)x2 hmz
	1/11	<b>46,XX,del(9)(q13q22.3)[19]/46,XX[3]</b>	<b>nuc ish(RP11-83L6x1,NAx2) [152/200]</b>	arr[GRCh37] 4q21.21qter78967598_190449761)x2 hmz, <b>9q21.11q22.2(70836004_93720200)x1</b>
20	3/10	46,XY[8]	nuc ish(AML1x2,AML1 dimx1,TELx2)[75/200],(RP11-473O3,RP11-83L6)x2[200]	arr[GRCh37] 21q11.2q22.12(14458134_35887336)x3,21q22.12qter(36508666_48090943)x3
	4/13	<b>47,XY,del(9)(q13q32),+21[2]/47,XY,+21[9]/46,XY[3]</b>	<b>nuc ish(RP11-473O3x1,RP11-83L6x2)[32/200],(D7Z1,DYZ3)x1[64/200]</b>	arr[GRCh37] <b>(7)x1,9q21.11q31.1(71016011_103789519)x1</b> ,21q11.2q22.12(14458134_35887336)x3,21q22.12qter(36508666_48090943)x3
21	3/12	46,XY,del(20)(q11q13)[10]/46,XY[7]	nuc ish(MAPRE1,PTPRT)x1[141/200],(MLLx2)[200]	arr[GRCh37] 20q11.21q13.12(30534356_44645176)x1
	11/15	<b>86~94,XXYY,+8,+10,+20,+20,del(20)(q11q13)x4,+22,+22[cp18]/46,XY,del(20)(q11q13)[2]/46,XY[2]</b>	nuc ish(MAPRE1,PTPRT)x1[35/200],(MLLx4)[179/200]	arr[GRCh37] <b>11q24.3q25(128341860_132440264)amp,15q13.3q21.3(33355970_58451444)x1,20pterq11.21(60770_31062521)x3</b> ,20q11.21q13.13(31095323_46890188)x1, <b>20q13.13qter(46913361_62949120)x3,(22)x3</b>
22	1/13	46,XY,del(5)(q13.1q33.3)[14]/46,XY[2]	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[70/200]	arr[GRCh37] 5q13.1q33.3(67641530_159094570)x1
	7/13	<b>51~57,XY,+1,del(5)(q13.1q33.3),+del(5)(q13.1q33.3),+8,+9,+10,+11,+i(11)(q10),+14,+15,+20,+21,+22[15]/46,XY,del(5)(q13.1q33.3)[2]</b>	nuc ish( <b>D5S23/D5S721x3,EGR1x1</b> )[124/200]/(D5S23/D5S721x2,EGR1x1)[17/200]	arr[GRCh37] <b>(1)x3</b> ,5q13.1q33.3(67661646_159336714)x1, <b>(8)x3,(9)x3,(10)x3,(11q)x3,(14)x3,(15)x3,17p13.3p13.1(3057790_8022201)x2 hmz,(20p)x3,(21)x3,(22)x3</b>

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
23	5/13	46,XX[12]	nuc ish(D5S1518E/D5S1976,CDC25C/EGR1,RPS14)x2[200],(RP11-478P5X3,d17z1X2)[50/200]	NA
	9/14	<b>46,XX,del(5)(q21q33.2)[11]/46,XX[11]</b>	nuc ish( <b>D5S23/D5S721x2,EGR1x1,D8Z2x2</b> )[118/ <b>200</b> ],(RP11-478P5X3,d17z1X2)[68/200]	arr[GRCh37] <b>5q14.3q31.2(86154334_138028931)x1</b> ,17q25.1(71847867_72671867)x3
24	9/13	46,XX[18]	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[69/200],(D7Z1,D7S486)x2[200]	NA*
	11/14	<b>45,XX,psu dic(4;7)(4pter--&gt;4q?22::7q22--&gt;7pter),del(5)(q14q33.3)[7]/46,XX[5]</b>	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[55/200],( <b>D7Z1x2,D7S486x1</b> )[73/200]	arr[GRCh37] <b>4q22.3q23(97014074_99628913)x1,4q24q25(102855450_108147947)x1,4q25(108603909_113876610)x1,4q26(115773886_119780053)x1,4q27qter(123091557_191016517)x1,5q14.3q33.3(84770250_156167232)x1,7q21.11qter(86226947_159128529)x1</b>
	6/16	<b>46~47,XX,del(3)(p?),psu dic(4;7)(4pter--&gt;4q?22::7q22--&gt;7pter),del(5)(q14q33.3),-21[15]/46,XX[2]</b>	NA	arr[GRCh37] <b>3p24.3p24.2(18483241_24267540)x1,3p24.1p14.1(28387717_69197110)x1,3p14.1p13(69735450_70303554)x1,3p13p13(71081671_72069354)x1,3q22.2q23(135572440_140713161)x1,3q24q26.2(143750591_168692945)x1,3q26.2q26.33(169419017_180728329)x1,4q22.3q22.3(95052980_95620038)x1,4q22.3(96330542_96599363)x1,4q22.3q23(97035565_99613991)x1,4q24q25(102908945_113933886)x1,4q26(115544327_119776136)x1,4q27qter(123042393_190790881)x1,5q14.3q33.3(84797824_156186802)x1,7q21.11qter(86240465_159118566)x1,(11)x3,21q21.2q22.12(25015399_36998014)x1</b>
25	7/12	46,XY[22]	nuc ish(D8Z2,NA)x2[200]	arr[GRCh37] 17q23.1q24.1(58161499_63315996)x2 hmz
	7/13	<b>47,XY,+8[12]/46,XY[8]</b>	<b>nuc ish(D8Z2x3,NAx2)[28/200]</b>	arr[GRCh37] <b>(8)x3</b> ,17q22q24.1(56455260_63315996)x2 hmz

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
26	6/10	46,XX,del(5)(q22q33)[1]/46,XX[15]	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[199/300],(RP11-511I2,RP1-159A19)x2[200]	NA*
	2/12	<b>46,XX,del(1)(p34.1p?36.3),del(5)(q31;q33)[4]/46,XX[18]</b>	nuc ish(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[1159/200], <b>(RP11-511I2x1,RP1-159A19x2)[22/100]</b>	arr[GRCh37] <b>1p36.32p35.3(4710475_29724365)x1,5q14.3q33.3(85685772_155950824)_x1</b>
<b>Skupina 3 – dvě aberace</b>				
27	9/13	46,XX,t(2;3)(p21;q26.3)[12]/46,XX[10]	NA	arr[GRCh37] 11q14.2q21(87212783_92812055)x2 hmz
	12/14	<b>46,XX,+1,dic(1;16)(p11.2;q11.2),t(2;3)(p21;q26.3)[9]/46,idem,del(12)(p11.2)[13]</b>	nuc ish(ETV6x1)[90/200]	<b>arr[GRCh37] 1q21.1q21.21(45212590_148809863)x3,1q21.2qter(149775877_249218792)x3,11q13.2qter(67088720_134772654)x2 hmz,12p13.31p12.1(9994935_24818220)x1,16q11.2qter(46467474_90148393)x1</b>
28	3/13	47,XX,del(5)(q14q34),+8[19]/46,XX[3]	nuc ish(CBFBx2),(TP53,D17Z1)x2[200],(D5S23/D5S721x2,EGR1x1)[168/200],(D8Z2x3,NAx2)[166/200]	NA
	11/14	<b>47,XX,del(5)(q14q34),+8,del(16)(q21q24.2)[12]/46,XX[9]</b>	nuc ish(CBFBx1)[145/200],(D5S23/D5S721x2,EGR1x1,D8Z2x3)[159/200]/(D5S23/D5S721x2,EGR1x1,D8Z2x2)[8/200]	arr[GRCh37] 5q21.2q35.1(104249634_168601706)x1,8p23.3p21.3(73832_19553754)x3,8p21.3qter(22303403_146294070)x3, <b>16q21q22.1(66251108_68180697)x1,16q23.3q24.1(83159025_86282135)x1,17p13.1(6881312_7605861)x1</b>

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
29	2/11	46,XX[5]	nuc ish(D5S1518E/D5S1976x2,CDC25C/EGR1x1, RPS14x1)[46/200]	arr[GRCh37] 5q14.3q33.3(87611404_157316154)x1,6q26(162289193_162777223)x1
	5/16	52~54,XX,+del(X)(q?),+1,+2,del(5)(q14q33.3),+6,+8,+der(10)t(8;10)(?;q?),-12,+14,der(19)t(10;19)(q?;?),+21,+21,inc[c p8]	nuc ish(D5S1518E/5S1976x2,CDC25C/EGR1x1)[138/200],(MLLx3)[35/200],(D8Z2x3,D16Z3x2)[57/200],(D7Z1,D7S486)x2[200]	arr[GRCh37] (1)x3,(2)x3,5q14.3q33.3(87534734_157427372)x1,6pterq26(219055_162267756)x3,6q26(162302687_162748288)x1,6q26qter(162799322_170921030)x3,(8)x3,10p15.3p11.1(102539_39124316)x3,(11)x3,(14)x3,(21)x3,(X)x1
Skupina 4 – tři a více aberací				
30	6/12	45,XY,der(1)dup(1)(p31.2p36.3)psu dic(1;21)(p36.3;p11.1)inv(1;21)(p36.3;q11.1),del(5)(q13.2q33.3),del(6)(p?21p?21),t(19;20)(?p13.3;?q13.1)[3]/46,XY,del(5)(q13.2q33.3)[1]/46,XY[11]	nuc ish(N-MYCx2),(ETV6,RUNX1)x2[200],(hTERTx2,CDC25C/EGR1x1,CSF1R/RPS14x1)[80/200]	arr[GRCh37] 1pterp31.3(14921_62240298)x3,5q14.3q34(85289028_161270401)x1
	9/13	45,XY,der(1)dup(1)(p31.2p36.3)psu dic(1;21)(p36.3;p11.1)inv(1;21)(p36.3;q11.1),del(5)(q13.2q33.3),del(6)(p?21p?21),t(19;20)(?p13.3;?q13.1)[cp18]/46,XY,del(5)(q13.2q33.3)[2]/46,XY[2]	NA	arr[GRCh37] 1pterp31.3(14921_62553522)x3,5q14.3q34(85505206_161556282)x1,7q21.11q21.2(79570282_91524331)x1,7q21.3q22.1(96104029_99822669)x3,7q22.1qter(99864927_159064815)x1,19p13.3(3190850_5129546)x3,(19q)x3,20p12.3p12.2(6210143_9370555)x1,20p12.1p11.21(12272214_22977116)x1,20q11.21(29624299_31147230)x3,20q11.21q13.2(31184537_54733512)x1,20q13.31q13.32(55341523_57820868)x1,20q13.32qter(57849869_62949120)x3,(22q)x3

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
30	3/14	44~46,XY,der(1)dup(1)(p31.2p36.3)psu dic(1;21)(p36.3;p11.1)inv(1;21)(p36.3;q11.1),del(5)(q13.2q33.3),der(7)t(7;16;20)(q?;q?;q?),t(19;20)(?p13.3;?q13.2),-20,der(22)t(22;22)(p11.1;q11.1),+r(22)(q?q?),+r(22)(q?q?)[cp8]/41~43,X,-Y,der(1)dup(1)(p31.2p36.3)psu dic(1;21)(p36.3;p11.1)inv(1;21)(p36.3;q11.1),der(3)t(3;13)(q?26;q?21),del(5)(q13.2q33.3),dic(7;19;20)(q?;q?;q?),der(12)t(12;21)(q24.1;q22),-13,der(18)?del(18)(p?)del(18)(q?)ins(18;13)(q?;q?11;?21),t(19;20)(?p13.3;?q13.1),-21,der(22)t(22;22)(p11.1;q11.1),+r(22)(q?q?),+r(22)(q?q?)[cp10]	NA	arr[GRCh37] 1pterp31.3(14921_62580085)x3,5q14.3q34(85366353_161588583)x1,7q21.11q21.2(79647764_91586739)x1,7q21.3q22.1(96606581_99822669)x3,7q22.1qter(99939854_159128529)x1, <b>18q11.2q21.1(20016546_47169747)x1,18q21.33qter(60918344_78012800)x1</b> ,19p13.3(3475333_5587055)x3,(19q)x3,20p12.3p12.2(6210143_9338946)x1,20p12.1p11.21(12547303_23009491)x1,20q11.21(29833416_31147230)x3,20q11.21q13.2(55341523_57568085)x1,20q13.31q13.32(55341523_57501198)x1,(22q)x3
31	3/14	Neinformativní	nuc ish(EVI1x4)[188/200]	arr[GRCh37] 3q12.1q12.3(98810284_101708664)x4,3q12.3q26.2(101734132_167785071)x1,3q26.2qter(167805878_197946555)x4
	2/15	47,XY,del(3)(q13.2q26.2),der(21)t(3;21)(q25.1;q21),+der(21)t(3;21)(q13.2;q31)[21]/48,XY,del(3)(q13.2q26.2),der(21)t(3;21)(q25.1;q21),+der(21)t(3;21)(q13.2;q31),+der(21)t(3;21)(q13.2;q31)[21]	nuc ish(5'EVI1x4,3'EVI1x3)(3'EVI1 sep 5'EVI1x3)[117/200]/(5'EVI1x5,3'EVI1x4)(3'EVI1 sep 5'EVI1x4)[67/200]	arr[GRCh37] 3q12.1q12.3(98810284_101708664)x4,3q12.3q26.2(101734132_167785071)x1,3q26.2qter(167805878_197946555)x4
32	10/11	46,XY,-11,t(11;21)(q24;q22),+der(11)t(11;21)(q24;q22)[cp17]	nuc ish(MLLx2)[200]	arr[GRCh37] 11q24.1qter(121934635_134945136)x1,21q21.1qter(16493286_48090943)x3

ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
32	4/13	46,XY,-11,t(11;21)(q24;q22),+der(11)t(11;21)(q24;q22)[3]/48,idem,+13,+19[12]	NA	arr[GRCh37] 11q24.1qter(122000580_134945136)x1,(13)x3,(19)x3,21q21.1qter(16493286_48090943)x3
33	9/12	46,XX[18]	nuc ish(D8Z2,NA)x2[200]	arr[GRCh37] 1p31.3p21.2(64599289_102069907)x2 hmz,2q34q36.1(211536392_224097340)x2 hmz,3q21.2q22.1(124486993_130300650)x2 hmz,5p14.3p13.2(22397625_34628854)x2 hmz,10q22.2q23.1(76446305_82212193)x2 hmz,14q22.3q24.2(56825369_73452687)x2 hmz,17q24.3q25.3(70360728_76425176)x2 hmz
	4/14	47,XX,+8[15]/46,XX[1]	nuc ish(D8Z2x3,D16Z3x2)[98/200]	Neinformativní
34	11/14	45~47,XY,der(1)t(X;1)(?;q?32),der(6)del(6)(p?)del(6)(q?),+8,der(18)t(6;18)(?;?q21),-21[7]/46,XY[7]	nuc ish(D8Z2x3,D16Z3x2)[120/200]	Neinformativní
	6/15	47,Y,der(X)t(X;21)(p?;q?),der(1)t(X;1)(q?;q?32),der(5)t(5;7)(q35;q36),der(6)del(6)(p12)t(6;18)(q13;q?),der(7)t(6;7)(p12;q31),+8,inv(12)(q14q24.3),der(14)t(14;17)(q24;q24),der(17)t(1;17)(?;q24).der(18)t(6;18)(q13;q12),der(20)t(20;21)(q11.2;q?)t(14;21)(q24;q?),del(21)(q21)[20]/46,XY[2]	nuc ish(D8Z2x3,NAx2)[112/200]/(D8Z2x4,NAx2)[24/200]	arr[GRCh37] 1q41q42.11(222456645_224210592)x1,1q42.12q42.13(224836501_227599009)x1,6q14.1q14.1(79326460_80570045)x1,7q22.1(101138377_102097170)x1,7q34qter(139037516_159128529)x1,(8)x3,12q13.13q13.2(53968482_54946378)x1,12q13.3(57163306_57516863)x1,12q22(93914573_95350955)x1,12q24.33(132399257_133153230)x1,14q23.1(59604497_60530085)x1,18q11.2q12.1(23492680_31345336)x1,18q12.2(35209596_36276066)x1,18q12.3(37656649_43286829)x1,18q21.2(52734880_53007191)x1,18q21.2q22.1(53564724_65802035)x1,18q22.1qter(65829637_78012800)x1,20q11.21q13.13(30324040_49642988)x1,22q12.1q12.2(29130702_29617813)x1,Xp11.4(39147743_40316851)x0



ID	Datum odběru (M/R)	Klasická cytogenetika/mFISH	I-FISH	aCGH/SNP
35	2/13	45,XY,dic(1;13)(p36.3;p11)dup(1)(p36.2p22.3),t(7;17)(q31;q21)[8]/46,XY[13]	nuc ish(D1Z5x2,RP1-159A19x3)[45/200]	arr[GRCh37] 1p36.33(105997_581135)x1,1p36.33p36.32(781026_4932372)x3,1p36.23p31.1(8231945_77521903)x3,1p31.1p22.3(84742755_87406734)x1,1p22.3p22.1(87464722_93089752)x3,1p22.1p12(93129968_120370139)x1,7q36.1(149191034_150771554)x1,8q23.3q24.11(116213012_117792044)x1,17pter p13.1(72083_10356816)x2 hmz,17q11.2(28776533_30529838)x1,17q21.31(44000224_44399484)x1,17q21.31q21.33(44762589_48261478)x1
	9/13	<b>58~64&lt;3n&gt;,XYY,+X,+1,dic(1;13)(p36.3;p11)dup(1)(p36.2p22.3)x2,+2,-3,-4,+6,+7,t(7;17)(q31;q21)x2,-9,dic(9;9)(p?;?),+10,del(10)(q11.2),t(2;10)(q21;q22),del(11)(p11.2),-12,-18,+21,-22[16]/</b> 45,XY,dic(1;13)(p36.3;p11)dup(1)(p36.2p22.3),t(7;17)(q31;q21)[3]/46,XY[1]	<b>nuc ish(D5S23/D5S721,EGR1)x3[120/200],(D7Z1,D7S486)x3[114/200]/(D7Z1,D7S486)x4[15/200],(MLLx3)[97/200],(D8Z2x3,NAx2)[73/200]</b>	NA*
	5/12	46,XX,del(5)(q13q33),t(9;13)(q21.1;q12)[15]	nuc ish(D5S23/D5S721x2,EGR1x1)[151/200],(RP11-315L5x1,D12Z3x2)[104/200],(RP11-23B15x1,RP11-473O3x2)[77/200]	arr[GRCh37] 2 p22.2p22.1(37049540_38678046)x1,5q14.3q33.3(84797870_155815431)x1,9q22.33(100449413_101577876)x1,12q22(93175735_95154113)x1,12q24.11q24.12(111679322_112147949)x1,13q14.11q14.12(41446202_45612057)x1,13q14.2q14.3(49556777_51911439)x1
	8/13	<b>45,XX,del(5)(q13q33),der(7)t(7;16)(q11.23;p11.2),t(9;13)(q21.1;q12),-16[7]/46,XX,del(5)(q13q33),t(9;13)(q21.1;q12)[3]/46,XX[2]</b>	<b>nuc ish(RP11-315L5x1,D12Z3x2)[94/200],(RP11-314C9x1,RP11-271A22x2)[50/100]</b>	arr[GRCh37] 2 p22.2p22.1(37111189_38760721)x1,5q14.3q33.2(84770250_155618381)x1,7q11.23qter(76557995_159128529)x1,12q22(93134680_95154113)x1,13q14.11q14.12(41525631_45684387)x1,13q14.2q14.3(49556777_51860869)x1,16p11.2qter(32573838_90266785)x1

**Příloha č. 2: Svobodova K.,** Lhotska H., Hodanova L., Pavlistova L., Vesela D., Belickova M., Vesela J., Brezinova J., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Siskova M., Jonasova A., Cermak J., Michalova K., Zemanova Z.: Cryptic aberrations may allow more accurate prognostic classification of patients with myelodysplastic syndromes and clonal evolution. *Gene Chromosomes Cancer*. 2020, 59:396-405.

**Příloha č. 3:** Brezinova J., Sarova I., **Svobodova K.**, Lhotska H., Ransdorfova S., Izakova S., Pavlistova L., Lizcova L., Skipalova K., Hodanova L., Markova J., Zemanova Z., Cermak J., Jonasova A., Michalova K.: *ASXL1* gene alterations in patients with isolated 20q deletion. *Neoplasma*. 2019, 66(4):627-630.

**Příloha č. 4: Svobodova K., Zemanova Z., Lhotska H., Novakova M., Podskalska L., Belickova M., Brezinova J., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Berkova A., Siskova M., Jonasova A., Cermak J., Michalova K.:** Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of *TP53* are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2016, 42:7-12.

**Příloha č. 5: Svobodová K., Zemanová Z., Lhotská H., Nováková M., Březinová J., Belíčková M., Berková A., Šárová I., Lizcová L., Izáková S., Jonášová A., Čermák J., Michalová K.: Získaná uniparentální disomie v buňkách kostní dřeně nemocných s myelodysplastickými syndromy a komplexním karyotypem. Transfuze Hematol. dnes. 2015, 3:126–134.**

**Příloha č. 6:** Zemanova Z., Michalova K., Buryova H., Brezinova J., **Kostylkova K.**, Bystricka D., Novakova M., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Ransdorfova S., Krejcik Z., Dostalova Merkerova M., Dohnalova A., Siskova M., Jonasova A., Neuwirtova R., Cermak J. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. Leuk. Res. 2014, 38:537-544.

**Příloha č. 7:** Brezinova J., Sarova I., Buryova H., Markova J., Ransdorfova S., Izakova S., **Kostylkova K.**, Soukupova J., Zemanova Z., Michalova K.: Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zincfinger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. Br. J. Haematol. 2014, 164:142–159.